

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA - DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

UNITA' OPERATIVA DI CLINICA DERMATOLOGICA

TESI DI LAUREA

## **MODELLO DI ZEBRAFISH DI MICOSI FUNGOIDE**

Relatore: Ch.mo Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

Laureando: Matteo Polita

ANNO ACCADEMICO 2021/2022







# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>pag.1</b>
<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>pag.3</b>
<b>I. INTRODUZIONE .....</b>	<b>pag.5</b>
1.1 Linfomi cutanei primitivi .....	pag.5
1.1.1 Classificazione .....	pag.5
1.1.2 Epidemiologia .....	pag.7
1.1.3 Eziopatogenesi .....	pag.8
1.1.4 Manifestazioni cliniche .....	pag.8
1.1.5 Diagnosi .....	pag.9
1.1.6 Staging.....	pag.10
1.1.7 Terapia.....	pag.12
1.1.8 Prognosi e qualità di vita.....	pag.13
1.2 Micosi fungoide.....	pag.14
1.2.1 Generalità .....	pag.14
1.2.2 Epidemiologia .....	pag.15
1.2.3 Eziologia.....	pag.15
1.2.4 Patogenesi.....	pag.16
1.2.5 Clinica .....	pag.19
1.2.6 Anatomia patologica .....	pag.28
1.2.7 Diagnosi .....	pag.31
1.2.8 Stadiazione e prognosi .....	pag.35
1.2.9 Terapia.....	pag.40
1.3 Lo zebrafish come modello in dermatologia.....	pag.48
1.3.1 Lo zebrafish.....	pag.49
1.3.2 La cute dello zebrafish .....	pag.52
1.3.3 Infiammazione cutanea .....	pag.53
1.3.4 Zebrafish come modello in oncodermatologia.....	pag.54
1.3.5 Direzioni future .....	pag.62

1.3.6 Conclusioni .....	pag.63
<b>II. SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>pag.65</b>
<b>III. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag.67</b>
3.1 Trasfezione delle cellule di micosi fungoide .....	pag.67
3.2 Xenotrapianto.....	pag.69
3.3 Suddivisione nei diversi gruppi e lotti .....	pag.69
3.4 Acquisizione delle immagini .....	pag.70
3.5 Quantificazione dei segnali.....	pag.70
3.4 Analisi istologiche .....	pag.70
3.5 Analisi statistiche .....	pag.70
3.8 Approvazione etica .....	pag.71
<b>IV. RISULTATI.....</b>	<b>pag.73</b>
<b>V. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....</b>	<b>pag.79</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>pag.83</b>







## ABSTRACT

### Background

Mycosis fungoides (MF) is the most recurrent form of primary cutaneous T-cell lymphoma. It is characterized by an idle clinical onset and by the progression through the three different stages of tumour patches, plaques, and nodules. The treatment of early stages of the disease occurs through topical therapies, which have reported positive results, while the treatment of advanced stages involves systemic or combined therapies which have to this day demonstrated poor prognoses.

### Objectives

The core purpose of this study is the development of the first experimental zebrafish model of mycosis fungoides by introducing, through xenografting, human cutaneous lymphoma cells MyLa CD4<sup>+</sup> into zebrafish embryos on day two following fertilization.

The parameter used to assess the effectiveness of engraftment and proliferation of cancer cells was global mortality.

An additional secondary objective was included, in which the aim was to determine the variation in mortality starting from a number of different transplanted cells.

### Materials and methods

The mycosis fungoides cell line known as MyLa CD4<sup>+</sup>, purchased by Sigma-Aldrich (Catalog N° 95051032), was initially transfected, by electroporation technique, with the DNA plasmid pMax-GFP, specially made for eukaryotic expression and purchased by biotechnology company Amaxa in such a way as to make these cells express a fluorescent green protein and therefore be distinguishable from the zebrafish's own cells.

Once the alteration had been verified, the cells were deposited in the centre of the yolk of each zebrafish embryo on day 2 post-fertilization by means of microinjection.

For the purpose of this study, day two post-fertilization zebrafish were divided into two groups in which the mortality was assessed during a four-day timeframe. The control group, i.e. the one in which no transplant was performed, was made up of four subgroups, for a total of 85 fish; the transplanted group also consisted of four subgroups, for a total of 61 fish (of which 48 transplanted with 100-200 cells and 13 transplanted with <10 cells).

## **Results**

The day four mortality parameter following engraftment (six days after fertilization) for the control group was 4/85, resulting in an overall mortality of 4.7%, while the transplanted group presented a mortality of 44/48, with an overall mortality of 91.7%, thus representing a significant difference between the two groups. The transplanted batch with <10 cells had a number of deaths equal to 5/13, with a calculated mortality rate of 38.5%. The mortality rates of the transplanted batches were compared with the control group, using the Chi-square statistical test, showing a statistically significant difference.

## **Conclusions**

The xenotransplantation experiments performed to evaluate the proliferation of mycosis fungoides cells in zebrafish embryos have given very positive and extremely encouraging results, confirming the possible use of this animal species as a model for the study of this pathology. The cell implantation has therefore provided an excellent response and the cancer cells have demonstrated a remarkable adaptation within the embryonic microenvironment to the point of having a very high proliferative rate, resulting in the ability to lead to the death of embryos with extraordinary speed.

This demonstrates that this model can be used in the future to evaluate the effectiveness of innovative methods, such as photoimmunotherapy or to comprehend the serviceability of specific monoclonal antibodies against cancer cells, evaluating the decrease of mortality or a improvement of the mean survival of zebrafish embryos.

## RIASSUNTO

### **Presupposti dello studio**

La micosi fungoide (MF) è la forma di linfoma primitivo cutaneo a cellule T più frequente, caratterizzata da un decorso clinico indolente e dalla progressione attraverso i tre diversi stadi di chiazza, placca e nodulo tumorale. Il trattamento degli stadi iniziali della patologia avviene mediante terapie topiche, con buoni risultati, mentre la cura degli stadi avanzati prevede terapie sistemiche o combinate con prognosi ad oggi infausta.

### **Scopo dello studio**

L'obiettivo principale di questo studio è la realizzazione del primo modello sperimentale di zebrafish di micosi fungoide, attraverso lo xenotrapianto di cellule di linfoma cutaneo umane MyLa CD4+ in embrioni di zebrafish al secondo giorno post fecondazione.

Il parametro utilizzato per verificare l'efficacia dell'attecchimento e l'effettiva proliferazione delle cellule neoplastiche è la mortalità globale.

L'obiettivo secondario è invece stato quello di determinare la variazione di mortalità partendo da un numero di cellule trapiantate differenti.

### **Materiali e Metodi**

La linea cellulare di micosi fungoide denominata MyLa CD4+, acquistata dalla ditta Sigma-Aldrich (N° catalogo 95051032) è stata per prima cosa trasfettata, mediante tecnica di elettroporazione, con un plasmide a DNA pMax-GFP, realizzato appositamente per l'espressione eucariotica e acquistato dalla compagnia biotecnologica Amaxa in modo tale da far esprimere a queste cellule una proteina verde fluorescente e differenziarle dalle cellule proprie dello zebrafish.

Le cellule, una volta verificata l'avvenuta modifica, sono state depositate al centro del tuorlo di ogni embrione di zebrafish a 2 giorni post-fecondazione mediante una metodica di micro-iniezione.

Ai fini dello studio, gli zebrafish sono stati divisi in due gruppi e ne è stata valutata la mortalità per quattro giorni. Il gruppo di controllo, ovverosia quello in

cui non è stato effettuato alcun trapianto, è composto da quattro lotti, per un totale di 85 embrioni; il gruppo trapiantato è composto anch'esso da quattro lotti, per un totale di 61 embrioni (di cui 48 trapiantati con 100-200 cellule e 13 trapiantati con <10 cellule).

## **Risultati**

La mortalità a quattro giorni post-trapianto (sei giorni post-fertilizzazione) per il gruppo di controllo è stata di 4/85 ottenendo una mortalità globale del 4,7%, mentre per il gruppo trapiantato con 100-200 cellule si è ottenuta una mortalità di 44/48, con una mortalità globale del 91,7%. Il lotto trapiantato con <10 cellule ha avuto un numero di decessi pari a 5/13 con una mortalità calcolata del 38,5%.

Le mortalità dei lotti trapiantati sono state messe a confronto con il gruppo di controllo, utilizzando il test statistico Chi-quadrato, denotando una differenza statisticamente significativa.

## **Conclusioni**

Gli esperimenti di xenotrapianto eseguiti per valutare la proliferazione di cellule di micosi fungoide in embrioni di zebrafish hanno dato risultati molto positivi ed estremamente incoraggianti, confermando il possibile utilizzo di questa specie animale come modello per lo studio della patologia. L'impianto cellulare ha perciò fornito un'ottima risposta e le cellule tumorali hanno dimostrato un notevole adattamento all'interno del microambiente embrionale al punto da possedere un elevatissimo tasso proliferativo, risultando in grado di portare alla morte degli embrioni con straordinaria velocità.

In ottica futura, quindi, questo modello potrà essere utilizzato per la valutazione dell'efficacia di metodiche innovative, come la fotoimmunoterapia o al fine di comprendere l'utilizzabilità di anticorpi monoclonali specifici contro le cellule tumorali, valutando caso per caso la riduzione della mortalità o un allungamento della sopravvivenza media degli embrioni di zebrafish.

# I. INTRODUZIONE

## 1.1 Linfomi cutanei primitivi

Con linfomi cutanei primitivi (di seguito: PCL, *Primitive Cutaneous Lymphomas*) s'intende un gruppo eterogeneo di linfomi non Hodgkin ad andamento variabile che rappresenta la seconda più comune forma di linfomi extranodali, dopo quelli coinvolgenti il tratto gastrointestinale [1].

Essi rappresentano un complesso gruppo di patologie comprendenti più di 100 distinte entità, indicate nella più recente classificazione WHO-EORTC, e definite da peculiari caratteristiche cliniche istopatologiche, morfologiche, immunofenotipiche e genetiche.

Per definizione tali linfomi si presentano a livello cutaneo senza alcuna evidenza di coinvolgimento extra-cutaneo al momento della diagnosi ed entro 6 mesi dalla scoperta della patologia [2]. La maggior parte di essi rimane confinata a livello cutaneo per molto tempo, avendo di fatto un comportamento indolente e portando ad avere una prognosi nettamente maggiore rispetto ai linfomi con istologia simile in altri distretti [1].

### 1.1.1 Classificazione

In ragione del criterio dell'origine cellulare, è possibile suddividere i PCL nelle due categorie dei *linfomi cutanei a cellule T (cutaneous T cell lymphomas, CTCLs)* e dei *linfomi cutanei a cellule B (cutaneous B cell lymphomas, CBCLs)*. Nettamente superiore, nel mondo occidentale, si riscontra l'incidenza dei primi rispetto ai secondi: il 75-80% di tutti i PCL sarebbe infatti rappresentato dai CTCLs; solamente nel restante 20-25% dei casi sarebbe attestata la presenza di CBCL [3].

A tal proposito, dal 2005, la World Health Organization - European Organization for Research and Treatment of Cancer (WHO-EORTC) è il gold standard per la diagnosi e la classificazione dei PCL. Nell'agosto 2018 l'ultima revisione di tale classificazione è stata pubblicata nella quarta edizione della *WHO Classification of Skin Tumor Blue Book* in cui sono state aggiunte alcune patologie provvisorie e la terminologia di alcune condizioni è stata modificata [2].

La Tabella I indica la più recente classificazione dei linfomi primitivi cutanei con annesse frequenze in percentuale e sopravvivenze a 5 anni.

WHO-EORTC Classification 2018	Frequency, %*	5-y DSS, %*
<b>CTCL</b>		
MF	39	88
MF variants		
Folliculotropic MF	5	75
Pagetoid reticulosis	<1	100
Granulomatous slack skin	<1	100
SS	2	36
Adult T-cell leukemia/lymphoma	<1	NDA
Primary cutaneous CD30 <sup>+</sup> LPDs		
C-ALCL	8	95
LyP	12	99
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	1	87
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	<1	16
Chronic active EBV infection	<1	NDA
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, rare subtypes		
Primary cutaneous $\gamma/\delta$ T-cell lymphoma	<1	11
CD8 <sup>+</sup> AECTCL (provisional)	<1	31
Primary cutaneous CD4 <sup>+</sup> small/medium T-cell lymphoproliferative disorder (provisional)	6	100
Primary cutaneous acral CD8 <sup>+</sup> T-cell lymphoma (provisional)	<1	100
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, NOS	2	15
<b>CBCL</b>		
PCMZL	9	99
PCFCL	12	95
PCDLBCL, LT	4	56
EBV <sup>+</sup> mucocutaneous ulcer (provisional)	<1	100
Intravascular large B-cell lymphoma	<1	72

**Tabella 1.** Frequenze relative e prognosi dei PCL nella classificazione WHO-EORTC del 2018 [2]. CD8<sup>+</sup> AECTCL, linfoma primitivo cutaneo aggressivo epidermotropo CD8<sup>+</sup>; DSS, disease-specific survival; NDA, no data available; NOS, not otherwise specified.

Analizzando i dati sopra riportati, si osserva che la micosi fungoide è la variante più comune di PCL e rappresenta il 60% circa dei CTCL e il 40-50% di tutti i PCL. Nella classificazione WHO-EORTC la micosi fungoide follicolotropica (FMF), la reticolosi pagetoide (PR) e la cute lassa granulomatosa (GSS) sono riconosciute come varianti distinte della MF per le loro distintive caratteristiche clinicopatologiche e prognostiche. Mentre la PR e la GSS sono estremamente rare, la FMF costituisce circa il 10% di tutti i casi di MF [4,5].

La sindrome di Sézary (SS) è una rara forma leucemica di CTCL, tipica dell'età adulto-anziana, ed è caratterizzata dalla triade tipica: eritrodermia pruriginosa, linfadenopatia generalizzata e la presenza di cellule di Sézary, ovverosia cellule T a nuclei cerebriformi circolanti [2,3,6].

Le malattie linfoproliferative cutanee primitive a cellule T CD30<sup>+</sup> sono il secondo gruppo più frequente rappresentando circa il 25% di tutti i CTCL [2]. Questo gruppo di patologie è costituito prevalentemente dalla Papulosi Linfomatoide (LyP), ampio genus comprensivo a sua volta di uno spettro di patologie suddivisibili in cinque diversi sottotipi, e dal linfoma cutaneo anaplastico a grandi

cellule (C-ALCL) [3]. In particolare è rilevante sottolineare l'importanza della presentazione e del decorso clinico quali criteri decisivi per discriminare queste due ultime patologie, dacché la papulosi linfomatoide e il linfoma cutaneo anaplastico a grandi cellule si presentano con caratteristiche istologiche e fenotipiche del tutto sovrapponibili [7,8].

Le rimanenti forme di CTCLs sono rare e prese complessivamente rappresentano meno del 10% di tutti i CTCLs [3].

Passando ora alla trattazione dei CBCL, si annoverano tra questi tre forme principali: il linfoma primitivo cutaneo della zona marginale (PCMZL), il linfoma cutaneo primitivo centro follicolare (PCFCL) ed il linfoma cutaneo primitivo a grandi cellule B "leg type" (PCDLBCL, LT) [3].

Nelle ultime decadi, i risultati degli studi genetici hanno contribuito ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di questi linfomi, rendendo così possibile la generazione di nuovi markers classificativi, diagnostici, prognostici e terapeutici addizionali [2,9].

### **1.1.2 Epidemiologia**

I PCL costituiscono la seconda forma più frequente di linfomi extra-nodali, con un'incidenza nel mondo occidentale che si aggira intorno a  $1/10^5$  casi per anno [10].

Nei paesi occidentali, la maggior parte dei CTCL sono rappresentati dalla micosi fungoide e dalla sindrome di Sézary, mentre nel sudest asiatico risultano predominanti altri tipi di CTCL [11,12]. Diversamente, se in occidente i CBCL costituiscono circa il 20% di tutti i PCL, in Asia la loro diagnosi ricorre con percentuali molto superiori [1].

Rispetto al recente passato, l'incidenza dei linfomi appena citati risulta in aumento; tuttavia, questa crescita è solo in parte dovuta a un effettivo incremento del numero dei casi, dovendo anche imputarsi alla sempre maggiore sensibilità degli strumenti diagnostici.

Recenti studi rilevano un elevato incremento di casi nei sottotipi più rari di PCL, mentre costante è l'incidenza dei casi nei già descritti sottotipi di PCL quali MF e LyP [13].

Da ultimo, osservando l'incidenza dei CTCL in riferimento all'intervallo di età del paziente, si nota che questi sono maggiormente presenti nell'età adulto-anziana, con età media alla diagnosi stimata di 55 anni, e solo di rado si riscontrano casi in pazienti giovani [5,14]; mentre, considerando il gruppo etnico, invece, è nettamente superiore la presenza dei tumori in parola negli afroamericani rispetto alla popolazione caucasica, a sua volta più colpita/più soggetta alla patologia di quella asiatica [15,16].

L'incidenza tra uomini e donne è lievemente maggiore per i primi, benché tale scostamento si stia lentamente assottigliando [15]. Per quanto riguarda i CBCL, il rapporto di incidenza uomini-donne è di quasi 2:1, ed essi, contrariamente ai CTCL, si riscontrano maggiormente nei caucasici rispetto agli afroamericani [15].

### **1.1.3 Eziopatogenesi**

L'eziologia dei linfomi cutanei primitivi risulta tuttora ignota e si suppone che il processo che dà loro origine sia di tipo multifattoriale e multifasico [17]. L'ipotesi ad oggi maggiormente presa in considerazione vede una combinazione di stimoli cronici di natura genetica, ambientale, infettiva ed immunologica causare uno stato di iperattività infiammatoria, condizione alla base dello sviluppo del linfoma [18].

Come in tutte le patologie tumorali, sono necessarie mutazioni o difetti nella regolazione di geni che portano all'iperattivazione di geni oncogeni, all'inattivazione di geni oncosoppressori o all'alterazione dei meccanismi di riparo del DNA. Simili alterazioni, nel tempo, permettono la formazione di cloni cellulari neoplastici e lo sviluppo dapprima di una condizione preneoplastica e successivamente, con un numero sempre maggiore di mutazioni, ad una conclamata condizione neoplastica.

### **1.1.4 Manifestazioni Cliniche**

I linfomi primitivi cutanei nel loro complesso hanno una presentazione clinica estremamente variegata e dipendente dalla patologia specifica.

Per quanto attiene alla micosi fungoide, sono il prurito e le ulcerazioni delle lesioni tumorali i sintomi maggiormente lamentati dai pazienti [19]. La sindrome



di Sézary presenta invece, oltre che un forte prurito, ipercheratosi palmo-plantare in combinazione con alopecia [2].

Nel gruppo delle malattie linfoproliferative cutanee primitive a cellule T CD30+, la Lyp si manifesta prevalentemente con papule cronicorricorrenti e piccoli noduli ulcerati che guariscono spontaneamente, mentre i C-ALCL si presentano come tumori solitari, raggruppati o solo raramente multifocali [19].

Per quanto riguarda i CBCL, i PCMZL si presentano come tumori rosso-brunastri, in giovani adulti e prevalentemente agli arti superiori e al tronco, i PCFCL si manifestano come lesioni rosso-bluastre a livello preferenzialmente dello scalpo, mentre i PCDLBCL-LT sono tipicamente riscontrabili in pazienti anziani, specialmente nelle donne, e si manifestano con lesioni rosso-brunastre nelle porzioni distali degli arti inferiori, con interessamento tipicamente bilaterale e progressiva ulcerazione delle stesse. Tali lesioni hanno carattere evolutivo, con remissione e recidive di patologia, rendendo la diagnosi clinica estremamente difficile.

### **1.1.5. Diagnosi**

Ai fini di una corretta diagnosi risulta fondamentale una valutazione completa del paziente, iniziando da una corretta anamnesi e proseguendo con un completo esame obiettivo ed istopatologico delle lesioni, supportato da reperti molecolari, immunofenotipici e talvolta, ove possibile, da una citometria a flusso [19]. Si precisa che l'esame istologico può essere effettuato, nel caso di lesioni singole, su una completa escissione del tumore e, nel caso di tumori multifocali, su biopsie incisionali [1].

In aggiunta, inoltre, si citano come esami rilevanti nel monitoraggio della patologia i test di laboratorio, di imaging, e la biopsia linfonodale o midollare, che possono essere eseguiti per valutare la severità della malattia [19].

Nonostante l'accuratezza degli esami appena citati e il persistere di un sospetto clinico, è essenziale la consapevolezza che si tratta di una diagnosi spesso complessa, che può dunque richiedere l'esecuzione di multiple biopsie [20]. Ad ogni modo, la clonalità dei T-cell receptor e della catena pesante delle immunoglobuline, per quanto riguarda rispettivamente le cellule T e B, sono di

supporto alla diagnosi, pur se la presenza di cloni cellulari ben può aversi anche in patologie cutanee reattive infiammatorie [21,22].

Comparati ai linfomi nodali, i riscontri clinici contribuiscono in misura nettamente superiore alla diagnosi di PCL; ne consegue che il tipo, e il numero, nonché la distribuzione e la percentuale di area di superficie corporea colpita (BSA) delle lesioni cutanee siano di fondamentale importanza per una corretta diagnosi differenziale [19].

### **1.1.6 Staging**

Un'adeguata stadiazione deve essere effettuata in tutti i pazienti con PCL per escludere la presenza di patologia extra cutanea e per scegliere di conseguenza il corretto approccio terapeutico. Per tale motivo risulta necessario aggiungere all'esame obiettivo completo gli esami emocromocitometrici e sierologici valutando anche la lattato deidrogenasi (LDH) [23].

Ai fini di una corretta stadiazione può anche risultare necessario eseguire degli esami di imaging, tra cui vi sono l'RX torace, la TC con mezzo di contrasto e la FDG-PET/TC. I PCL non sono universalmente avidi di FDG, ragion per cui quest'ultimo esame non si considera di routine; tuttavia, è stato osservato che, almeno nella maggior parte dei casi, la captazione a livello cutaneo è variabile, mentre i coinvolgimenti sottocutanei o in altri distretti vengono usualmente visualizzati alla PET/TC [24].

In base alla localizzazione della patologia, potrebbe risultare opportuno eseguire alcune biopsie incisionali a livello linfonodale, epatico, splenico e/o osteomidollare. La biopsia del midollo osseo deve essere effettuata in linfomi con comportamento clinico intermedio/aggressivo, cosa al contrario non necessaria nelle forme indolenti [23].

Proseguendo nella disamina degli esami indicati, la citometria a flusso è invece raccomandata per pazienti in cui viene sospettata la sindrome di Sézary.

Per la micosi fungoide e la sindrome di Sézary è stata redatta una classificazione dedicata, la TNMB-classification (Tabella II), che è stata recentemente incorporata nella classificazione TNM [25]. Tale classificazione specifica ha quindi permesso la creazione di un sistema di stadiazione clinica (Tabella III).

T (skin)	
T <sub>1</sub>	Limited patch/plaque (involving <10% of total skin surface)
T <sub>2</sub>	Generalised patch/plaque (involving ≥10% of total skin surface)
T <sub>3</sub>	Tumour(s)
T <sub>4</sub>	Erythroderma
N (lymph node)	
N <sub>0</sub>	No clinically abnormal peripheral lymph nodes
N <sub>1</sub>	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histologically uninvolved
N <sub>2</sub>	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histologically involved (nodal architecture uneffaced)
N <sub>3</sub>	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histologically involved (nodal architecture (partially) effaced)
N <sub>x</sub>	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; no histological confirmation
M (viscera)	
M <sub>0</sub>	No visceral involvement
M <sub>1</sub>	Visceral involvement
B (blood)	
B <sub>0</sub>	No circulating atypical (Sézary) cells (or <5% of lymphocytes)
B <sub>1</sub>	Low blood tumour burden (≥5% of lymphocytes are Sézary cells, but not B <sub>2</sub> )
B <sub>2</sub>	High blood tumour burden (≥1000/μl Sézary cells and positive clone)

**Tabella 2.** Classificazione TNMB per quanto riguarda la micosi fungoide e la sindrome di Sézary [23].

Clinical stage				
IA	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-1</sub>
IB	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-1</sub>
IIA	T <sub>1-2</sub>	N <sub>1-2</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-1</sub>
IIB	T <sub>3</sub>	N <sub>0-2</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-1</sub>
III	T <sub>4</sub>	N <sub>0-2</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-1</sub>
IVA <sub>1</sub>	T <sub>1-4</sub>	N <sub>0-2</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>2</sub>
IVA <sub>2</sub>	T <sub>1-4</sub>	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>	B <sub>0-2</sub>
IVB	T <sub>1-4</sub>	N <sub>0-3</sub>	M <sub>1</sub>	B <sub>0-2</sub>

**Tabella 3.** Sistema di stadiazione clinica per la micosi fungoide e la sindrome di Sézary [23].

### 1.1.7 Terapia

La maggior parte dei PCL ha un decorso clinico indolente e rimane localizzata a livello cutaneo per molto tempo.

I trattamenti utilizzati per la cura di tali linfomi possono essere distinti in due categorie: le terapie cutanee e le terapie sistemiche.

Le terapie cutanee sono le più efficaci in queste neoplasie, anche perché la terapia sistemica citotossica, che ha dimostrato una grande efficacia nei linfomi non cutanei ad interessamento linfonodale e viscerale, risulta avere efficacia parziale e di breve durata a livello cutaneo [23].

L'obiettivo della terapia è di controllare le lesioni cutanee e di minimizzare la morbilità.

I trattamenti cutanei più utilizzati e conosciuti sono: gli steroidi topici, dotati di azione anti-infiammatoria ed immunosoppressiva; le mostarde azotate topiche, che permettono l'attacco di gruppi alchilanti al DNA; i retinoidi topici (derivati della vitamina A); la fototerapia sottoforma di UVB o PUVA fotochemioterapia e la terapia radiante in forma localizzata o generalizzata nella cosiddetta *total skin electron beam therapy* (TSEBT) [23]. Negli stadi avanzati di patologia e nel caso di fallimento terapeutico con terapie topiche, queste ultime possono comunque essere utilizzate come adiuvanti a terapie radianti o sistemiche.

Tra i trattamenti sistemici, invece, si possono annoverare il metotrexate, inibitore dell'enzima diidrofolato reductasi; i retinoidi; l'interferone- $\alpha$  avente azione immunomodulatoria e usato di solito in combinazione con PUVA, bexarotene o fotoferesi [26,27]; la fotoferesi extracorporea; i farmaci citostatici quali gemcitabina e doxorubicina peghilata liposomiale [23], oltre ad alte dosi di chemioterapia associate ad un trapianto di midollo autologo o allogenico.

Tra i farmaci di nuova insorgenza che si stanno mostrando particolarmente efficaci nella pratica clinica si citano ancora: gli inibitori dell'istone deacetilasi come la Romidepsina e il Vorinostat; anti-metaboliti quale il Pralatrexate; anticorpi monoclonali come il Rituximab (anti-CD20) attivo sui CBCL; Brentuximab-Vedotin composto da un anticorpo monoclonale anti CD-30 associato ad un farmaco citostatico con effetto sui microtubuli; Mogamulizumab, anticorpo monoclonale anti-recettore 4 delle chemochine (CD194); Pembrolizumab e Nivolumab anticorpi monoclonali anti-PD-1.

### **1.1.8 Prognosi e qualità di vita**

La prognosi dipende dal tipo specifico di PCL: si stima che dei pazienti affetti da micosi fungoide solo il 15-20% muoia effettivamente a causa di tale patologia [28], mentre la sopravvivenza a 5 anni nella sindrome di Sézary si aggira intorno al 30-35%, soprattutto a causa delle complicanze infettive legate alle importanti disfunzioni immunitarie che si associano a tale patologia.

Entrambe le forme di malattie linfoproliferative cutanee primitive a cellule T CD30+ si connotano invece per avere una buona prognosi con una sopravvivenza a 10 anni stimata tra il 90-100% [3,29].

PCMZL e PCFCL hanno un ottima prognosi con una sopravvivenza a 10 anni stimata superiore al 90% [3,30,31].

Considerando la qualità di vita in costanza di malattia, nessuno strumento peculiare è stato predisposto per poterla valutare; tuttavia, studi dimostrano che i pazienti affetti da sindrome di Sézary e micosi fungoide soffrono di maggiori difficoltà rispetto ai pazienti affetti da altre condizioni dermatologiche [32].

## 1.2 Micosi fungoide

### 1.2.1 Generalità

La micosi fungoide è la forma più comune di PCL, rappresentando da sola circa il 40-50% di tutti i PLC e circa il 4% di tutti i linfomi non Hodgkin [3,9]. Da un punto di vista storico riveste un ruolo importante in quanto è stata, nel 1806, il primo linfoma maligno ad essere stato descritto dal dermatologo francese Jean-Louis Alibert [33]. Il nome “micosi fungoide” venne coniato qualche decade più tardi e rende conto della somiglianza con le lesioni sviluppate da infezioni fungine [34].

I pazienti con la MF classica, come originariamente descritta da Jean Alibert (1768-1837) e Ernest Bazin (1807-1878), rappresentano lo stadio iniziale di patologia, caratterizzata da chiazze o placche persistenti e progressive di aspetto squamoso localizzate in aree non fotoesposte [3]. Inizialmente si definì la stadiazione della patologia sulla base della manifestazione clinica della stessa individuando una fase premicotica in presenza di una chiazza, una fase micotica in presenza di una placca e la fase tumorale in caso di noduli. Difatti, la fase tumorale aggressiva era preceduta da un lungo periodo caratterizzato dalla presenza di chiazze o placche [35]. Nella seconda metà del secolo scorso iniziarono ad essere descritte molte altre varianti, caratterizzate anch'esse dall'invasione della cute da parte di cellule T atipiche, quali la micosi fungoide follicolotropica (FMF), la reticolosi pagetoide (PR) e la cute lassa granulomatosa (GSS). Solo nel 1975 si scoprì che le cellule che determinano l'insorgenza e lo sviluppo di tale patologia sono i linfociti T.

Secondo la definizione attuale, la MF è un CTCL composto da piccoli e medi linfociti T con nuclei cerebriformi o talvolta ipercromici con un fenotipo T-helper (anche se le varianti citotossiche non sono infrequenti). Nell'ultima classificazione WHO-EORTC del 2018, viene stabilito che la definizione di MF quale patologia debba essere utilizzata solamente per le forme caratterizzate dall'evoluzione nei tre caratteristici stadi poc'anzi citati o per le varianti con un decorso clinico analogo [9].

### 1.2.2 Epidemiologia

L'incidenza della MF è di 6-7 casi/10<sup>6</sup> con elevate variazioni regionali. Rispetto ai decenni precedenti, quando l'incidenza stimata era pari a circa 4 casi/10<sup>6</sup>, appare evidente come tale dato sia in netta crescita [16].

Considerando le differenze etniche, i pazienti maggiormente affetti sono i caucasici, seguiti dagli afroamericani, dagli ispanici ed infine dagli asiatici.

Tenendo conto delle fasce di età, si evidenzia come suddetto linfoma insorge più frequentemente in pazienti adulto-anziani con un'età media alla diagnosi intorno ai 55-60 anni. Anche bambini ed adolescenti possono ammalarsi, seppur raramente.

Prendendo in considerazione il genere si evidenzia una frequenza maggiore negli uomini rispetto alle donne con un rapporto maschi:femmine di circa 2:1 [16,34,36,37].

### 1.2.3 Eziologia

L'eziologia della MF è ad oggi sconosciuta, benché sia da evidenziare come le patologie dermatologiche croniche, con l'esposizione di lunga durata a vari allergeni e la predisposizione genetica possano giocare un ruolo importante nell'insorgenza della patologia.

A tale riguardo si sono avanzate due principali ipotesi. La prima vede come causa principale un agente virale che induce una disregolazione T cellulare con successiva trasformazione maligna. Ad oggi, però, gli studi effettuati non hanno dimostrato collegamenti certi con specifiche infezioni virali.

La seconda ipotesi vede invece come fattore trigger una stimolazione antigenica persistente nel tempo, che porta dapprima all'insorgenza di infiammazione cronica e da questa allo sviluppo di linfociti T maligni [38].

Riguardo all'eziopatogenesi, si evidenzia come nel tempo siano stati effettuati studi epidemiologici volti a vagliare se l'esposizione occupazionale a specifiche sostanze ed allergeni potessero rappresentare la causa dello sviluppo della patologia, senza però ottenere riscontri positivi. Allo stesso modo, le zone maggiormente colpite da tali patologia, ovvero quelle non fotoesposte, sono soggette solamente ad una minima esposizione da parte di sostanze ambientali e

questo è in opposizione alla seconda teoria che vedrebbe invece maggiormente implicate le estremità [39].

Si è osservata un'incidenza maggiore in pazienti che hanno ricevuto un trapianto d'organo, suggerendo di fatto che l'immunosoppressione potrebbe contribuire allo sviluppo della patologia.

## **1.2.4 Patogenesi**

### **Epidermotropismo**

Nella micosi fungoide l'epidermotropismo dei linfociti T è dovuto all'espressione da parte degli stessi di specifici recettori che ne permettono la localizzazione selettiva a livello cutaneo. Uno dei più importanti è l'*antigene linfocitario cutaneo* (CLA), che, tramite il legame con la *E-selectina* permette il reclutamento a livello dermico dalle venule post-capillari [40]. È stato inoltre osservato come anche le chemochine abbiano un ruolo importante nel reclutamento e nell'*homing* cutaneo mediante un legame con specifici recettori espressi da parte dei linfociti T maligni, tra cui i più importanti sono il CCR4 (legante CCL17 e CCL22), CCR10 (legante CCL27) e CXCR3 (legante CXCL9, CXCL10 e CXCL11) [41]. L'importanza dei recettori sopraenunciati è comprensibile anche dal fatto che le cellule di MF in stadio avanzato li presentano in minor numero portando alla perdita di epidermotropismo e alla diffusione della patologia a livello sistemico [41].

È stato osservato che l'espressione del recettore CCR7 nella fase tumorale della MF predispone ad una perdita dell'epidermotropismo ed alla progressione sistemica della malattia. Questo recettore risulta essere sovraespresso infatti anche nelle cellule maligne circolanti della sindrome di Sézary e sembra promuovere la migrazione delle cellule T verso gli organi linfoidi secondari e il sangue ed in generale portare dunque alla metastatizzazione [41,42].

### **Ambiente citochinico**

Studiando la variazione delle citochine espresse nei vari stadi della patologia è stato riscontrato che nelle fasi precoci di malattia è presente prevalentemente un profilo citochinico Th1, caratterizzato dall'espressione ad alti livelli di IL-2, IL-



12, INF- $\gamma$ , mentre nella fase tardiva vi è un'evoluzione verso un profilo citochinico Th2 [43].

Da un punto di vista macroscopico e di esame obiettivo, la risposta Th1 maggiormente pro-infiammatoria potrebbe essere legata all'aspetto eczematoso caratteristico delle fasi precoci di malattia, mentre la risposta Th2 delle fasi avanzate invece può essere associata alla proliferazione delle cellule tumorali oltre che all'indebolimento della risposta immunitaria.

Alcune citochine nello specifico, quali l'IL-7 e l'IL-15, prodotte sia dai cheratinociti sia dai linfociti maligni stessi, hanno dimostrato di avere un ruolo nella progressione della malattia e nella proliferazione delle cellule T della memoria [44]. Allo stesso modo, l'IL-2 ed il suo recettore IL-2R, tramite la fosforilazione di diverse proteine intracellulari come Janus kinase 3 (Jak3), Signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5) e Stat3, con la conseguente trasduzione del segnale a valle, portano ad uno stato di iperattivazione cellulare necessario alle cellule tumorali stesse [45].

La deviazione di risposta citochinica verso un tipo Th2 descritta precedentemente, con la successiva attenuazione della risposta immunitaria, comporta una maggiore suscettibilità alle infezioni cutanee, che si osserva appunto nelle fasi avanzate di MF.

### **Ambiente tumorale**

Negli stadi iniziali di MF l'ambiente tumorale è costituito prevalentemente da cellule immunitarie Th1 non maligne, da macrofagi e da cellule dendritiche (DC). Il riscontro in tale ambiente di cellule T CD8<sup>+</sup> e Treg ha valore prognostico positivo [46,47].

La presenza di DC immature sembra essere necessaria per la generazione del meccanismo di stimolazione antigenica cronica alla base dello sviluppo del linfoma (come descritto nel paragrafo "eziologia").

Tali cellule sembra svolgano una duplice ed antitetica funzione. Nelle fasi iniziali si pensa che possano essere stimulate dagli antigeni tumorali specifici e che promuovano, tramite lo stato infiammatorio da esse generato, la proliferazione incontrollata di cellule T maligne, portando di fatto allo sviluppo del linfoma [48]; nella fase avanzata di patologia, invece, le DC, attraverso la presentazione di specifici antigeni tumorali, sono in grado di generare una risposta immunitaria

antitumorale da parte delle cellule T citotossiche. A sostegno di ciò, il riscontro istologico di cellule dendritiche epidermiche è associato ad una prognosi migliore.

### **Sopravvivenza al sistema immunitario**

Un'importante interazione che permette al sistema immunitario di controllare le cellule maligne inducendone l'apoptosi è quella tra il recettore Fas ed il suo ligando FasL. Studi hanno evidenziato che, mentre nelle fasi iniziali le cellule tumorali sono Fas+, nelle fasi avanzate, invece, essendo l'espressione di tale recettore notevolmente ridotta se non assente, le cellule tumorali non vengono eliminate dal sistema immunitario [49]. Proprio per queste ragioni, la soppressione di Fas da parte delle cellule tumorali negli stadi avanzati è stato proposto come meccanismo di fuga immunitaria in tutti i CTCLs [50,51].

Un secondo meccanismo di svincolamento dalla risposta immunitaria è l'esaurimento funzionale delle cellule T, mediato o dal rilascio in cronico di molecole immunitarie inibenti o da un'alterata modulazione delle DC da parte delle cellule maligne. Ritorna in questo contesto il profilo citochinico Th2, caratterizzato da citochine immunosoppressive quali IL-10 e TGF- $\beta$ , che reprimono l'immunità antitumorale e impediscono la corretta maturazione delle DC. È stato suggerito, quindi, che l'interazione tra le cellule T e DC immature possa, anziché stimolare una risposta immunitaria anti-tumorale, indurre una tolleranza nei confronti degli antigeni tumorali [52].

### **Marker molecolari**

Ad oggi non è ancora stato identificato un marcatore tumorale specifico ed indispensabile per lo sviluppo di MF [53]. Per quanto concerne la patogenesi e la progressione della patologia, sono attualmente reputati importanti l'amplificazione del locus MYC, la perdita dei geni oncosoppressori TP53 e gli inibitori della chinasi ciclina dipendente 2A e 2B (CDKN2A e CDKN2B). Tutte queste alterazioni genomiche comportano una perdita nel controllo del ciclo cellulare e un'inibizione dell'apoptosi, fondamentali per la generazione del linfoma [54]. In realtà la maggior parte degli studi effettuati per la ricerca di eventuali marcatori tumorali sono effettuati su biopsie di MF in fase avanzata, di conseguenza non è del tutto chiaro se le anomalie cromosomiche riscontrate siano

effettivamente necessarie per lo sviluppo e la progressione del tumore oppure siano solo un epifenomeno legato all'instabilità genetica delle fasi avanzate.

Un'altra alterazione rilevata è una maggiore espressione di Notch, che sembra incidere significativamente sulla fase di progressione della malattia [55]. La via di segnale mediata da quest'ultimo porta infatti all'aumento della trascrizione di geni anti-apoptotici quali Bcl-2 e c-FLIP.

### **1.2.5 Clinica**

Dal punto di vista clinico, la MF può presentarsi nella sua forma classica “di Alibert-Bazin” o nelle sue numerose varianti.

#### **Forma classica**

La MF classica, anche detta di Alibert-Bazin, è suddivisa nei suoi tre diversi stadi di chiazza, placca e nodulo tumorale. I pazienti possono presentare queste lesioni in modo progressivo oppure possono sviluppare più di un tipo di lesione contemporaneamente [3].

Nella fase di chiazza possono essere presenti singole e/o multiple macule squamo-eritematose non palpabili e non infiltrate di varie dimensioni (usualmente inferiori ai 5 cm) dai contorni solitamente ben definiti. Il colore può variare dall'arancione fino al rosso-violaceo. Le lesioni colpiscono prevalentemente le zone non fotoesposte con interessamento in genere più precoce a livello delle aree intertriginose quali la piega inframammaria per il genere femminile, la fessura interglutea, i cavi ascellari e gli spazi interdigitali delle mani o dei piedi.

L'eruzione può essere asintomatica oppure dare una sensazione di intenso prurito. Occasionalmente si presentano lesioni patologiche che possono essere transitorie e che scompaiono spontaneamente in assenza di esiti cicatriziali.

La diagnosi in questa fase precoce è di regola molto complessa. Il paziente può descrivere una dermatite cronica di lunga durata (anche 10-20 anni) caratterizzata dalla resistenza alle classiche terapie topiche. In questo tipo di pazienti dovranno essere prelevati multipli campioni bioptici per cercare di giungere alla corretta diagnosi. Tale fase può durare per mesi o anni prima di progredire al successivo stadio di placca. Talvolta le placche sorgono *de novo* in zone di cute in precedenza apparentemente sane.

Benché le chiazze siano comunemente considerate una lesione precoce di patologia, queste sono frequentemente compresenti a placche o noduli nei pazienti in stadio avanzato.

La placca si presenta come una lesione infiltrata, ben delimitata, squamosa, palpabile di colore rosso-violaceo, variabilmente indurita e con frequenti ulcerazioni. Possono essere sia sopraelevate che depresse. Lesioni di questo tipo possono regredire spontaneamente oppure fondersi per formare un'unica placca di maggiori dimensioni caratterizzata da bordi anulari, arcuati o serpiginosi. Talvolta queste lesioni possono risolversi centralmente con la porzione attiva che si mantiene invece alla periferia.

Nei pazienti di colore le lesioni sono classicamente meno eritematose ed hanno un aspetto grigio-argenteo, caratteristica che le fa apparire ipopigmentate. Questa forma di MF entra in diagnosi differenziale e deve essere differenziata dalla vitiligine. I pazienti affetti da questa peculiare variante rispondono alla terapia con una graduale ripigmentazione cutanea, mentre la rilevazione di nuove aree di cute ipopigmentate è indicativa di una recidiva di patologia.

Le lesioni tumorali sono il segno di una patologia in fase avanzata. Come le lesioni precedentemente trattate, possono anch'esse essere solitarie, localizzate o generalizzate e possono insorgere ovunque, anche se è presente una predilezione per la faccia e per le pieghe cutanee quali ascelle, inguine, fossa antecubitale e piega inframmammaria nelle donne [35]. Il coinvolgimento mucoso è inusuale nelle prime fasi, mentre è osservabile negli stadi avanzati.

In questa fase le cellule neoplastiche assumono un comportamento biologicamente più aggressivo, con un accumulo progressivo di cellule tumorali che porta all'apparenza clinica di un nodulo dermico in espansione. I noduli si presentano lisci e di colore rosso-brunastri o rosso-violacei; hanno la tendenza ad erodersi ed ulcerarsi e, successivamente, a sovrainfettarsi.

Il tasso di crescita tumorale è variabile: le lesioni possono crescere rapidamente nel giro di poche settimane come rimanere relativamente stabili per mesi. Si può verificare talvolta anche una regressione parziale.

L'eritrodermia, definita dal coinvolgimento patologico di almeno l'80% dell'intera superficie corporea, può insorgere *de novo* o svilupparsi in corso di

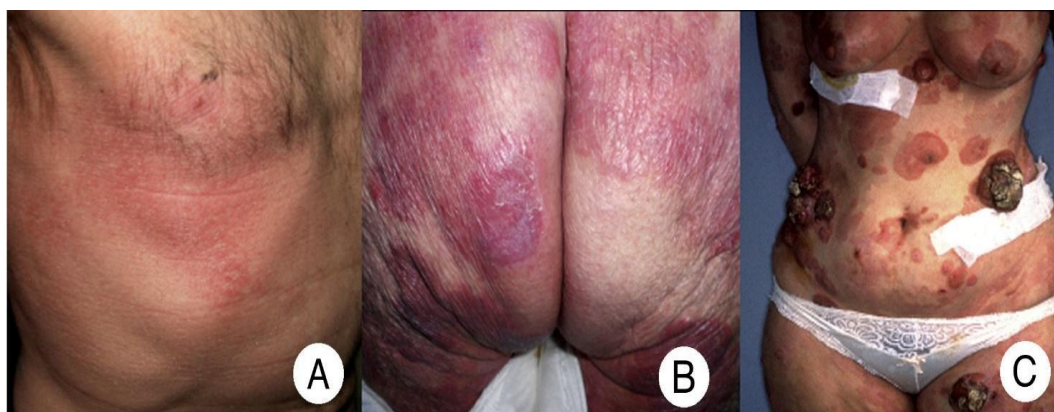
MF. Nel caso non vi sia una preesistente diagnosi di MF classica si parla di MF eritrodermica.

La pelle, se presente questa evoluzione, si presenta di un colore rosso brillante, con isole di cute ben differenziabili non coinvolte da malattia.

Questa condizione deve essere differenziata dalla sindrome di Sézary. Infatti, sebbene nel recente passato la MF e la sindrome di Sézary siano state entrambe incluse nel generico gruppo delle CTCLs, queste sono ora considerate dalla classificazione WHO-EORTC due entità separate in quanto mostrano differenti caratteristiche molecolari, prognostiche ed un approccio terapeutico differente [2]. Tale differenziazione si denota nel comportamento cellulare: mentre nella SS le cellule tumorali derivano dai linfociti T della memoria centrale e sono in grado di circolare liberamente a livello ematico, linfonodale e cutaneo, i linfociti T della memoria della MF sono invece di tipo effettore dotati di recettori specifici che permettono di essere reclutati e di risiedere a livello cutaneo [41,56].

Nelle fasi avanzate di patologia non è infrequente osservare l'evoluzione a linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) [57].

In caso di metastatizzazione le sedi più colpite risultano essere in ordine di frequenza i linfonodi, i polmoni, il fegato, la milza e più raramente altri distretti corporei [58]. Caratteristico è il fatto che, nonostante la conferma istologica di coinvolgimento metastatico viscerale, solo raramente sono stati riportati deficit funzionali.



*Figura 1. (A) MF classica in stadio di chiazza; (B) MF classica in stadio di placca; (C) MF classica in stadio nodulo-tumorale avanzato [59].*

### **Altri sintomi**

I pazienti lamentano per lo più febbre, brividi, perdita di peso, malessere generalizzato, insonnia causata dall'irrefrenabile prurito e alterazioni all'omeostasi della temperatura. Possono inoltre essere presenti ipercheratosi,

zone di fine desquamazione, fissurazione dei palmi delle mani e della pianta dei piedi, alopecia, ectropion, onicodistrofia ed edema malleolare. Queste lesioni portano deficit della deambulazione e di destrezza manuale.

Il prurito è solitamente molto intenso, tanto da impedire ai pazienti di addormentarsi, e può causare escoriazioni, essudazioni e sovrainfezioni secondarie.

### **Varianti clinico-istologiche**

La WHO-EORTC riconosce solamente tre varianti distinte di MF, con differenti caratteristiche clinico-patologiche, comportamento clinico e prognosi comparate alla MF classica [3]. Queste sono la Micosi fungoide follicolotropica (FMF), la Reticolosi pagetoide (PR) e la Cute lassa granulomatosa (GSS). Le altre varianti atipiche, invece, hanno invece spesso un decorso del tutto analogo a quello della MF classica. Poiché le varianti imitano di fatto molteplici condizioni infiammatorie cutanee benigne, la MF viene spesso definita la “grande imitatrice” [60].

#### **Micosi fungoide follicolotropica (FMF)**

È il più comune sottotipo patologico di MF, comprendente circa il 12% di tutti i pazienti affetti da MF [4,61–65].

Clinicamente si presenta con papule follicolari, chiazze localizzate in sede follicolare, placche indurite e un’inusuale perdita di peli nelle zone colpite. Occasionalmente la patologia può manifestarsi anche con lesioni acneiformi (comedoni e cisti) o cheratosi pilare-like [66]. Il distretto corporeo prevalentemente interessato è la regione della testa e del collo.

La variante è caratterizzata da infiltrati di cellule T follicolotropiche di piccole-medie dimensioni diffusi a livello del derma perifollicolare con o senza degenerazione dei follicoli piliferi [3,66]. In caso di distruzione dell’epitelio dei follicoli piliferi si può talvolta osservare una reazione granulomatosa [67].

Quando è presente una degenerazione mucinosa dei follicoli piliferi del cuoio capelluto si parla di mucinosi follicolare. Nei casi di infiltrati dermici diffusi con distruzione parziale o completa delle strutture epiteliali, la differenziazione tra FMF ed altri tipi di CTCL può essere complessa.

La trasformazione a grandi cellule definita dalla presenza di più del 25% di blasti o di blasti organizzati in cluster è stata riportata in più del 20% dei casi di FMF e tale trasformazione è più comune in questa variante rispetto alla MF classica [57,62].

Da un punto di vista epidemiologico tale variante interessa maggiormente i pazienti adulti ed è raramente osservata in bambini ed adolescenti [16,62]. Gli uomini risultano più colpiti rispetto alle donne.

La perdita di peli e capelli, soprattutto a livello sopraccigliare, prurito intenso correlato allo stadio di malattia e sovrainfezione batterica sono sintomi comuni di questa variante. Il prurito è spesso severo e rappresenta un parametro affidabile dell'attività di malattia [68].

Generalmente questa variante veniva considerata un sottotipo caratterizzato da un decorso biologicamente aggressivo e cattiva prognosi comparata allo stadio tumorale della MF classica [68]. Tuttavia, la MF follicolotropica è stata recentemente suddivisa in due pattern distinti con importanti implicazioni prognostiche, pattern che, in realtà rappresentano rispettivamente la fase precoce ed avanzata della medesima variante [66]: il pattern precoce gode di buona prognosi, mentre l'avanzato è caratterizzato da tassi di sopravvivenza simili alla fase tumorale della MF classica [65,66], anche se studi recenti hanno evidenziato come questa variante sia meno responsiva alle terapie topiche [68].

Nei bambini la FMF si presenta più frequentemente con placche ipopigmentate ed alopecia che entra in diagnosi differenziale con l'alopecia mucinosa sia da un punto di vista clinico che istopatologico [64].

Il coinvolgimento preferenziale di testa e collo, l'assenza di chiazze e placche a livello di tronco e natiche e l'assenza di cellule T atipiche epidermotropiche portano in prima battuta a non considerare la diagnosi di MF o altre CTCLs ma viene solitamente erroneamente interpretata come una patologia benigna dermatologica quale dermatite seborroica, dermatite atopica o rosacea.



**Figura 2.** (A) Manifestazioni cliniche di FMF: placche sovraorbicolari sinistre infiltrate con alopecia e lesioni cistiche; (B) gruppi di papule follicolari sul braccio sinistro; (C) placche infiltrate con papule ipercheratosiche a livello zigomatico sinistro; (D) tumore eritematoso e plurime lesioni cistiche a livello mandibolare destro [2].

### **Reticolosi pagetoide (PR)**

Questa variante si presenta solitamente come una chiazza o placca psoriasiforme o ipercheratosica solitaria, lentamente progressiva e usualmente localizzata alle estremità [3]. Contrariamente alla MF classica, non è stata fino ad ora osservata alcuna disseminazione extracutanea ed è anche per questo che la prognosi viene considerata eccellente [69].

Il termine di reticolosi pagetoide deve essere utilizzato solamente per la forma localizzata (di Worniger-Kolopp) e non per la forma disseminata (di Ketron-Goodman) [70].

Questa variante mostra un maggior epidermotropismo e pleomorfismo nucleare se comparata con la MF unilesionale; inoltre, rispetto a quest'ultima, si manifesta più frequentemente come lesione ipercheratosica.

Studi istopatologici rivelano una iperplasia psoriasiforme e talvolta verrucosa con marcata diffusione pagetoide epidermotropica di grandi linfociti atipici singoli o raggruppati in nidi, che occupano integralmente lo spessore dell'epidermide.





**Figura 3.** (A) *Reticolosi pagetoide*: placca solitaria eritematosa, ipercheratosica e psoriasiforme a livello del calcagno; pezzo istologico colorato con ematossilina-eosina in cui è presente l'iperplasia epidermica, (B) ipercheratosi, paracheratosi ed un infiltrato a livello delle papille dermiche [59].

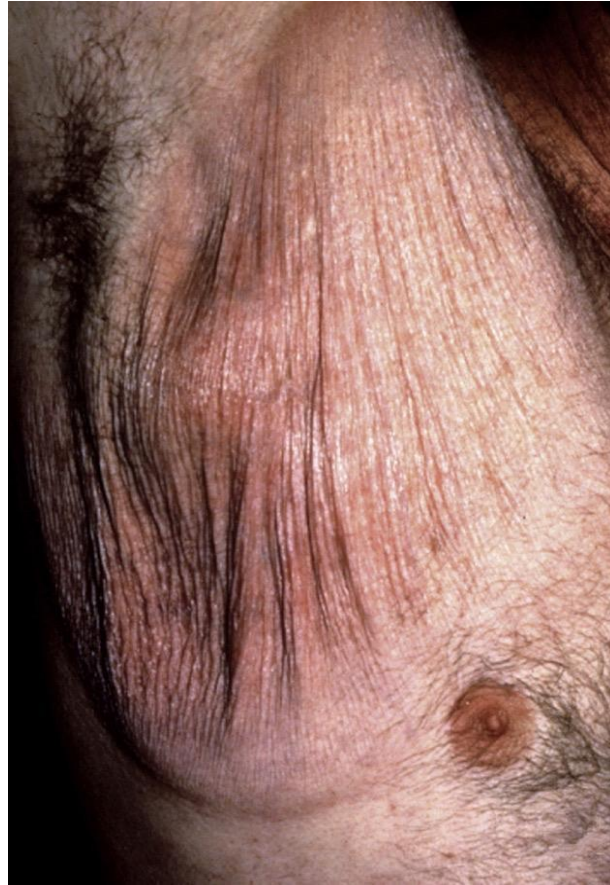
### **Cute lassa granulomatosa (GSS)**

È un raro sottotipo di MF caratterizzata da ingombranti pieghe cutanee in aree localizzate di cute con una predilezione per le ascelle e l'inguine [71,72]. Alla microscopia si evidenzia un denso infiltrato granulomatoso dermico di linfociti T di piccole-medie dimensioni. In aggiunta a questo si può osservare la presenza di cellule piccole e atipiche con nuclei cerebriformi, macrofagi e cellule giganti multinucleate. Si osserva comunemente una perdita di fibre di collagene, elastofagocitosi ed emperipolesi da parte delle cellule giganti multinucleate. Le cellule neoplastiche esprimono nella maggioranza dei casi un fenotipo T CD3+, CD4+, CD8- e mostrano un riarrangiamento dei geni del TCR [73].

Le lesioni cutanee iniziali, come nella MF classica, sono chiazze e placche che nel tempo evolvono in voluminose pieghe di cute atrofica a livello di ascelle e natiche che richiamano la *cutis laxa* [71,72].

In circa un terzo dei casi si è osservata un'associazione con altri linfomi maligni, inclusa la MF e il linfoma di Hodgkin [73]. La disseminazione extracutanea è estremamente rara, e la maggior parte dei pazienti presenta un decorso clinico indolente [60,73].

Il trattamento di questa variante è insoddisfacente, in quanto le terapie non hanno portato fino ad ora ad una risposta completa. Come già detto, la GSS è caratterizzata da un decorso clinico indolente e lentamente progressivo e, considerando il maggior rischio di sviluppare un secondo linfoma maligno, è necessario porre il paziente in follow-up a lungo termine.



*Figura 4. GSS: piega cutanea eritematosa a livello ascellare [59].*

### **Forme atipiche**

Vi sono numerose varianti che hanno comportamenti clinici del tutto simili alla MF classica e che prese singolarmente sono estremamente rare. La comparsa di tali varianti è comprensibile anche se non sempre prevedibile, in quanto nello stadio precoce il numero di cellule T maligne è piccolo e l'infiltrato dermico è costituito principalmente da linfociti T reattivi che producono citochine infiammatorie in gran parte responsabili dei pattern istologici.

Per tali varianti la diagnosi è particolarmente complicata, in quanto queste simulano numerose patologie infiammatorie cutanee. Una corretta diagnosi richiede un alto grado di sospetto e l'integrazione di tutte le caratteristiche clinico-patologiche e degli studi ancillari. Ai fini diagnostici risulta anche mandatorio un esame obiettivo di tutto il corpo al fine di accertarsi dell'estensione della patologia oltre che della coesistenza di lesioni caratteristiche di MF classica. Per migliorare la probabilità di effettuare la diagnosi istologica, i corticosteroidi topici devono essere interrotti almeno 2 settimane prima di effettuare la biopsia. Inoltre,

solitamente in questi casi è necessaria un'attenta osservazione e la ripetizione di periodiche biopsie [74].

Tali varianti, anche in virtù della loro rarità, vengono descritte brevemente nella Tabella VI sottostante.

<b>Variante</b>	<b>Presentazione clinica e caratteristiche peculiari</b>
<b>MF ipopigmentata</b>	Chiazze e placche ipopigmentate asintomatiche a livello di tronco e arti [75]. E' maggiormente frequente nei pazienti afroamericani ed in età giovanile [64,65].
<b>MF iperpigmentata</b>	Chiazze e placche iperpigmentate con possibile atrofia e fine desquamazione. L'incidenza è maggiore nei pazienti afroamericani [76].
<b>MF siringotropica</b>	Papule eritematose, chiazze o placche con accentuazione follicolare, spesso accompagnate da alopecia.
<b>MF unilesionale</b>	Singola lesione comparabile con la MF classica.
<b>MF eritema anulare centrifugo-like e MF- <i>erythema gyratum repens-like</i></b>	Chiazze o placche eritematose anulari o policicliche con crescita centrifuga.
<b>MF verrucosa</b>	Placche verrucose, ipercheratosiche e pruriginose.
<b>MF <i>acanthosis nigricans-like</i></b>	Lesioni papillomatose bruno-rossastre a livello delle zone intertriginose [77].
<b>MF bullosa/vescicolare</b>	Vesciche multiple con tensione di parete variabile e con facile tendenza allo sviluppo di ulcere.
<b>MF psoriasiforme</b>	Chiazze o placche psoriasiformi, eritematose e di notevole spessore che si

	associano ad alopecia ed a lesioni di tipo erosivo-ulcerativo [78].
<b>MF poichilodermatoso</b>	Lesioni atrofiche, teleangectasiche e alterazioni maculari del pigmento cutaneo [79].
<b>MF dermatosi purpurica pigmentata-like</b>	Lesioni purpuriche croniche associate a zone di alterazioni del pigmento cutaneo bruno-giallastre.
<b>MF interstiziale</b>	Chiazze o placche piane senza segni di atrofia o desquamazione.
<b>MF granulomatosa</b>	Variante istopatologica che può comparire sia all'esordio della MF sia dopo anni.
<b>MF ittiosiforme</b>	La cute si presenta diffusamente secca e desquamante [80].
<b>MF palmo-plantare</b>	Chiazze e placche eritematose e ipercheratosiche bilaterali a livello delle estremità.

*Tabella IV. Varianti di MF*

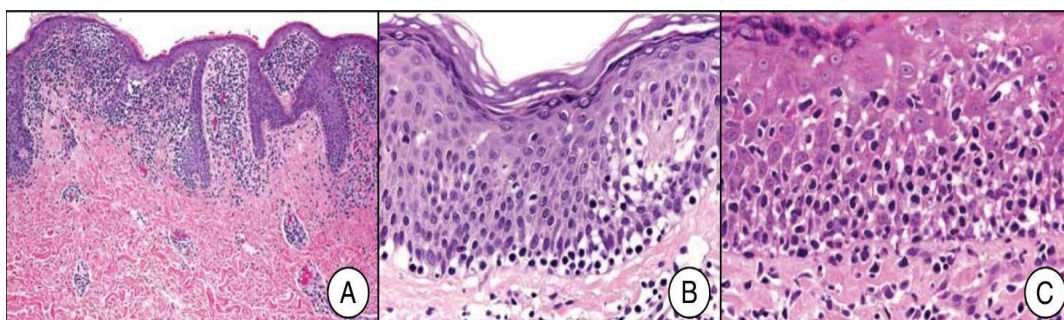
### 1.2.6 Anatomia patologica

Le lesioni, rilevate e descritte all'esame obiettivo, vengono quindi biopsiate e sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina ai fini di una corretta interpretazione [81].

Negli stadi di chiazza, placca e anche in quello eritrodermico le lesioni sono caratterizzate da un infiltrato a banda nella porzione superiore del derma composto da cellule T reattive e da linfociti T tumorali di piccole-medie dimensioni caratterizzati da nuclei convoluti e cerebriformi. Le cellule T neoplastiche mostrano uno spiccato epidermotropismo con formazione dei caratteristici aggregati intraepidermici definiti "microascessi di Pautrier" [35,82]. Anche se questi microascessi vengono considerati degli elementi distintivi di patologia possono essere assenti sia nelle lesioni precoci, in particolare nelle biopsie effettuate senza avere sospeso per tempo il trattamento in atto, sia in fase

avanzata di patologia [83]. Bisogna quindi enfatizzare il fatto che, anche se sono presenti dei criteri istopatologici per la diagnosi di MF in stadio precoce, la diagnosi definitiva può essere formulata solo previa attenta correlazione clinico-patologica.

Oltre alla mancanza di segni istologicamente patognomonici, sono stati osservati numerosi pattern di MF precoce analoghi a quelli riscontrati nelle dermatosi infiammatorie. Di aiuto in questi stadi di malattia può essere il riscontro di linfociti *halo* caratterizzati da un nucleo circondato da un'aureola ipocromica, di visibile epidermotropismo basale e di linfociti intraepidermici.

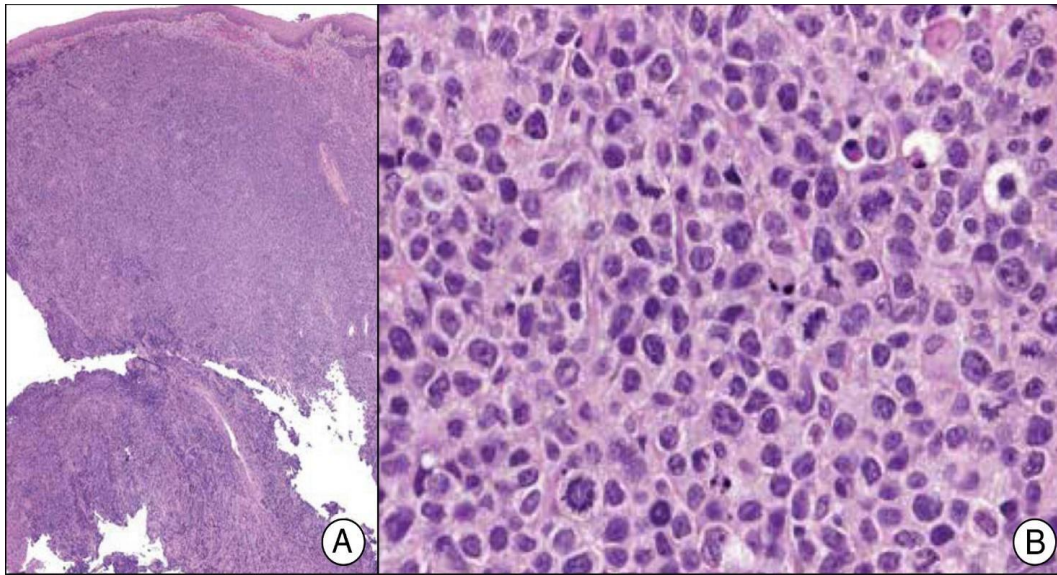


**Figura 5.** Caratteristiche istologiche di MF. (A) Infiltrato linfonodale a banda, con linfociti intraepiteliali e microascessi di Pautrier; (B) epidermotropismo basale; (C) linfociti intraepiteliali in un contesto di scarsa spongiosi [35].

Nello stadio tumorale si può invece osservare un infiltrato nodulare o diffuso coinvolgente l'intero derma e spesso anche il grasso sottocutaneo, mentre la componente epidermica è meno pronunciata. Talvolta può essere osservato angiocentrismo e distruzione vascolare. In questa fase, le lesioni risultano del tutto indistinguibili da altri tipi di linfomi a cellule NK/T sia primitivi sia secondari.

Negli stadi avanzati di MF i linfociti di grandi dimensioni, come immunoblasti, grandi cellule pleomorfe o grandi cellule anaplastiche, diventano prominenti all'interno dell'infiltrato neoplastico. La trasformazione a grandi cellule è definita dalla presenza di linfociti di notevoli dimensioni in percentuale maggiore del 25% o di grandi linfociti arrangiati in noduli [57,84]. Anche se la trasformazione in grandi cellule si osserva nella maggior parte delle fasi avanzate di MF, cluster di grandi linfociti possono essere talvolta evidenziati negli stadi di placca e chiazza [35].





**Figura 6.** Caratteristiche istologiche di MF. (A) Infiltrati linfoidi diffusi in assenza di coinvolgimento epidermico; (B) immagine ad alto ingrandimento con cellule di grandi dimensioni per avvenuta trasformazione in DLBCL [35].

### Immunofenotipo

Da un punto di vista immuno-istologico le cellule tumorali maligne presentano un fenotipo T-CD4<sup>+</sup> maturo caratterizzato da TCR $\beta$ <sup>+</sup>, TCR $\gamma$ <sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup> e TIA1<sup>-</sup>.

Una perdita parziale degli antigeni tipici delle cellule T come CD2, CD3, CD5, CD7 può essere una caratteristica della MF ed è stata proposta come criterio diagnostico per gli stadi precoci di malattia [85]. Tuttavia, la bassa frequenza di questa condizione e il fatto di non essere patognomonica rende tale reperto poco utile ai fini diagnostici.

I marker di citotossicità come TIA-1, granzima B e perforina sono negativi nei casi convenzionali di MF, ma in una minoranza dei casi può esserci un fenotipo citotossico CD8<sup>+</sup>, è di maggiore riscontro nei pazienti pediatrici. Si è osservato però che non vi sono differenze né cliniche né tantomeno prognostiche tra i due fenotipi helper e citotossico.

L'analisi dei geni del TCR richiede tecniche di biologia molecolare, come la Polymerase Chain Reaction (PCR) o il Southern Blot. Gli studi di clonalità si sono dimostrati di poca utilità in quanto rilevano riarrangiamenti clonali presenti però solamente in circa la metà delle biopsie di pazienti in stadi precoci. Il sequenziamento mediante PCR incrementa sia la sensibilità che la specificità e permette di caratterizzare al meglio i cloni neoplastici [22]. Di fatto, quindi,

nessun test molecolare di valutazione della clonalità né i marker fenotipici assumono un significato diagnostico negli stadi precoci della MF.

Il Thymocyte selection-associated high-mobility group box factor (TOX) si trova associato allo sviluppo di cellule T CD4+, CD8- nel timo, ma è soppresso nei linfociti T CD4+ maturi. Poiché tale fattore è invece espresso in maniera aberrante nella MF e nella sindrome di Sézary, si pensa possa essere utilizzato come marcatore per discriminare le lesioni precoci di MF dalle patologie infiammatorie cutanee alla biopsia. Bisogna però ricordare che l'espressione di TOX non è ristretta alle sole cellule tumorali CD4+, CD8- [86].

È stato osservato che nelle lesioni avanzate di MF vi possono essere un gran numero di linfociti B reattivi CD20+, che possono talvolta formare dei veri e propri centri germinativi. La numerosa presenza di questo tipo cellulare può mascherare la vera natura T cellulare dell'infiltrato neoplastico e non deve essere falsamente interpretato come linfoma B cellulare. In questo contesto bisogna però segnalare che linfomi composti (ovvero caratterizzati da due distinti linfomi rispettivamente B e T cellulari) sono stati descritti in letteratura [35].

### **1.2.7 Diagnosi**

La diagnosi di MF risulta particolarmente ostica, in primis a causa della presenza di numerose varianti cliniche ed istologiche, nonché per l'analogia con numerose patologie dermatologiche sia benigne che maligne.

Tale diagnosi si basa sulla combinazione di reperti clinici e istologici, in quanto entrambi, se presi singolarmente, sono eccessivamente eterogenei ed aspecifici per poter porre diagnosi [3,34,35].

Altra difficoltà da menzionare deriva dal fattore temporale: dalle fasi iniziali della patologia alla enunciazione diagnostica possono passare svariati anni [82].

La diagnosi di MF richiede una fase di approfondita anamnesi ed esame obiettivo, seguita dall'esecuzione di una o multiple biopsie cutanee con esami istologici ed immunoistologici per caratterizzarne il quadro. In aggiunta a ciò, può essere svolto lo studio immunofenotipico e del riarrangiamento del TCR, oltre ad altri esami ancillari.

### **Esame obiettivo**

L'esame obiettivo è di fondamentale importanza per porre il sospetto di MF: le lesioni cutanee riscontrate, già trattate in modo approfondito nella sezione "clinica", devono essere accuratamente descritte e misurate per poter indicare la percentuale di superficie corporea coinvolta [83].

In questa fase, oltre all'analisi delle lesioni, dovranno essere presi in considerazione ed indagati anche i linfonodi periferici, ricercando eventuali alterazioni nella forma, nella dimensione e nelle caratteristiche di fissità o la presenza di dolorabilità. Tutti i linfonodi anormali o di dimensioni maggiori di 1,5 cm dovranno essere ulteriormente indagati tramite imaging o tramite *fine needle aspiration biopsy* (FNAB) [83].

### **Biopsia cutanea ed esame istologico**

Solitamente vengono eseguite più biopsie cutanee nel tempo, perché le caratteristiche istologiche non sono distintive e sono simili a quelle osservate in molte altre patologie infiammatorie cutanee. Al fine di aumentare la sensibilità diagnostica, risulta fondamentale individuare correttamente la sede e la lesione da sottoporre a biopsia. Tale scelta dovrà ricadere sulle lesioni di maggiori dimensioni o su quelle maggiormente indurite e, nel caso in cui fossero presenti più stadi di lesione contemporaneamente, andrà realizzata una biopsia per ciascuna tipologia [60].

Oltre a ciò, è importante, come già ribadito nei capitoli precedenti, sospendere il trattamento in atto almeno due settimane prima della biopsia, in quanto l'infiltrato linfocitario potrebbe essersi drasticamente modificato impedendo di fatto la finalizzazione della diagnosi.

Si rileva che, a livello istologico, un marcato epidermotropismo e i microascessi di Pautrier, le due caratteristiche istopatologiche di MF precoce maggiormente specifiche, sono presenti solamente in circa il 20% dei casi nello stadio di chiazza [81].

I riscontri istologici divisi per stadio di patologia sono già stati affrontati nel capitolo precedente "anatomia patologica".



### **Immunofenotipo**

Anche l'analisi dell'immunofenotipo ed il riarrangiamento dei geni del TCR risultano di fondamentale importanza. Il più comune fenotipo riscontrato è il T helper CD4+ maturo, ma anche altri fenotipi possono essere talora riscontrati, quali il CD8+, CD30+, CD56+ CD4/CD8 doppio positivo o doppio negativo.

Il fenotipo CD8+ è maggiormente associato alla variante di MF iper o ipopigmentata, mentre il CD4/CD8 doppio negativo risulta spesso associato alla variante di MF eritema anulare centrifugo-like [87].

### **Esami ancillari di approfondimento**

Tali esami non sono essenziali tanto per la diagnosi, quanto per una corretta stadiazione e prognosi del paziente. In questo contesto può essere opportuno richiedere un esame emocromocitometrico completo, un pannello metabolico completo, gli indici di funzionalità d'organo, la lattato deidrogenasi ed esami di imaging per valutare se è presente un effettivo coinvolgimento sistemico [3,60].

In caso di coinvolgimento ematologico sarà importante prescrivere la citometria a flusso per valutare la presenza e la quantità di cellule di Sézary circolanti o la presenza di linfociti atipici.

### **Diagnosi differenziale**

La diagnosi differenziale può essere posta con altre patologie sia benigne che maligne della cute, non esclusivamente per somiglianza clinica ma anche istologica.

Per quanto riguarda i primi due stadi, la diagnosi differenziale si pone con la dermatite cronica, la psoriasi, la parapsoriasi, la dermatite da contatto, l'eczema, la tinea corporis e la vitiligine.

Per quanto riguarda la fase tumorale, la diagnosi differenziale si pone invece con i linfomi a cellule B, i carcinomi cutanei, la sarcoidosi, le infezioni fungine profonde, le infezioni batteriche atipiche, la lebbra, la leishmaniosi, la pitiriasi rubra pilaris, la psoriasi, la dermatite atopica, la reazione a farmaci e la dermatite seborroica.

Altri linfomi con cui può entrare in diagnosi differenziale sono il linfoma cutaneo T  $\gamma/\delta$ , il linfoma cutaneo primitivo a cellule T CD8+ epidermotropo aggressivo, la papulosi linfomatoide, il linfoma cutaneo anaplastico a grandi

cellule, le manifestazioni cutanee di linfoma NK/T extranodale nasal-type, la sindrome di Sézary, la leucemia/linfoma T cellulare dell'adulto (ATLL) ed altri [35].

L'analisi molecolare dei riarrangiamenti del TCR può essere utile nella differenziazione della MF dalle lesioni benigne cutanee. Il riscontro dello stesso clone in lesioni di siti cutanei distanti suggerisce una MF piuttosto che un disordine infiammatorio.

Le diagnosi differenziali in dipendenza della variante di MF sono indicate nella tabella sottostante.

Types of mycosis fungoides	Diagnosis differed
Folliculotropic	Alopecic lesions on the scalp: alopecia areata, trichotillomania, cicatricial alopecias Erythematous lesions on the scalp: seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, psoriasis Follicular spiky papules: keratosis pilaris, lichen spinulosus, pityriasis rubra pilaris, lichen planopilaris Hairless patches/flat plaques: alopecia mucinosa Acneiform lesions: Favre-Racouchot syndrome, chloracne, follicular-comedogenic graft-versus-host disease, rosacea, adult onset acne
Hypopigmented	Vitiligo, tinea corporis, tinea versicolor, pityriasis alba, postinflammatory hypopigmentation, progressive macular hypomelanosis, idiopathic guttate hypomelanosis, sarcoidosis, leprosy
Hyperpigmented	Postinflammatory hyperpigmentation, fixed drug eruption, pigmented contact dermatitis, erythema dyschromicum perstans (ashy dermatosis), cutaneous amyloidosis, atrophoderma of Pasini and Pierini, idiopathic eruptive macular hyperpigmentation
Ichthyosiform	Sarcoidosis as a specific cutaneous finding of the disease Conditions that are associated with acquired ichthyosis as a secondary finding
Papular and pityriasis lichenoides chronica-like	Lymphomatoid papulosis type B, pityriasis lichenoides chronica, persistent arthropod bite reactions, lymphomatoid drug eruption
Palmaris et plantaris	Dermatophyte infection, psoriasis, eczematous dermatitides, secondary syphilis, hyperkeratotic lichen planus, verrucae, granuloma annulare
Psoriasiform	Psoriasis
Pagetoid reticulosis	Papulosquamous, eczematoid, infectious or neoplastic diseases
Unilesional	Papulosquamous, eczematoid, or dermatophytic diseases, Bowen disease
Poikilodermatous	Acquired poikiloderma such as a manifestation of collagen vascular disease, or radiation dermatitis
Chronic pigmented purpura-like	Chronic pigmented purpura
Figurate erythema-like	Erythema annulare centrifugum, erythema gyratum repens, Lyme disease, fungal infection
Verrucous	Inflammatory linear verrucous epidermal nevus, palmoplantar hyperkeratosis, verrucae vulgaris, keratosis lichenoides chronica, keratoacanthoma, seborrheic keratosis, porokeratosis of Mibelli
Bullous	Bacterial or viral infections, autoimmune bullous disorders, drug eruption
Pustular	Infections, pustular psoriasis, drug eruption
Interstitial	Interstitial granuloma annulare, inflammatory stage of localized scleroderma, interstitial granulomatous dermatitis
Granulomatous	Benign granulomatous skin diseases
Other	Atopic dermatitis, generalized nonspecific dermatitis

**Tabella V.** *Diagnosi differenziale delle singole varianti di MF* [60].

Per facilitare la diagnosi della MF precoce, nel 2005 l'*International Society for Cutaneous Lymphomas* (ISCL) ha proposto un algoritmo che considera in combinazione le caratteristiche cliniche, istopatologiche, insieme a quelle immunoistochimiche e al riarrangiamento dei geni del TCR [88].

Tale algoritmo è presentato nella Tabella VI sottostante.

Criteria	Scoring system
<b>Clinical</b>	
<i>Basic</i>	
Persistent and/or progressive patches/thin plaques	Two points for basic criteria and two additional criteria. One point for basic criteria and one additional criterion.
<i>Additional</i>	
1. Non-sun-exposed location	
2. Size/shape variation	
3. Poikiloderma	
<b>Histopathologic</b>	
<i>Basic</i>	
Superficial lymphoid infiltrate	Two points for basic criteria and two additional criteria. One point for basic criteria and one additional criterion.
<i>Additional</i>	
1. Epidermotropism without spongiosis	
2. Lymphoid atypia	
<b>Molecular biologic</b>	
Clonal TCR gene rearrangement	One point for clonality One point for one or more criteria
<b>Immunopathologic</b>	
1. <50% CD2+, CD3+ and/or CD5+ T cells	
2. <10% CD7+ T cells	
3. Epidermal/dermal discordance of CD2, CD3, CD5 or CD7	

ISCL, International Society for Cutaneous Lymphomas; MF, mycosis fungoides; TCR, T-cell receptor.

**Tabella VI.** Algoritmo ISCL per la diagnosi precoce di MF [89].

## 1.2.8 Stadiazione e prognosi

Data una diagnosi certa di MF, per poter selezionare il più corretto approccio terapeutico diventano mandatorie sia un'adeguata stadiazione per escludere un interessamento cutaneo secondario da parte di un linfoma extracutaneo che la determinazione dell'estensione della patologia. Per quanto concerne la stadiazione, si osserva che il decorso clinico si protrae per anni o decenni e si stima che oltre il 90% dei pazienti con MF in fase precoce non progredisca alla fase tumorale e non mostri manifestazioni extracutanee di patologia nella loro vita [3,9].

Una corretta stadiazione prevede la scrupolosa valutazione dell'intera superficie cutanea, la radiografia del torace, l'ecografia dell'addome e dei linfonodi periferici maggiormente coinvolti quali cervicali, ascellari ed inguinali. Oltre a ciò, sono indicati gli esami ematochimici che devono includere l'emocromo completo oltre alla valutazione degli enzimi epatici, della funzionalità renale, i livelli di LDH e la conta dei linfociti T. Lo staging può essere completato dalla TC/PET-TC e dalle analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari dei linfonodi e degli organi che in seguito a tali analisi si sono rivelati sospetti.

La stadiazione per la MF è in comune con la sindrome di Sézary: essa si ottiene seguendo la classificazione TNMB della ISCL/EORTC del 2007, che si basa sullo studio dei seguenti quattro parametri *tumor, nodes, metastasis and blood* [25].

Con il parametro T vengono indicate le dimensioni e l'estensione delle lesioni cutanee. Il tipo di lesioni cutanee (tra chiazza, placca o nodulo) viene messo in correlazione all'estensione tramite il prodotto con appositi fattori di correzione come evidenziato nella tabella sottostante, che indica l'area di superficie corporea (*Body Surface Area, BSA*) coinvolta seguendo il punteggio modified Severity Weighted Assesment Tool (mSWAT) [90].

Body Region	% BSA in Body Region	Assessment of Involvement in Patient's Skin		
		Patch*	Plaquet†	Tumor‡
Head	7			
Neck	2			
Anterior trunk	13			
Arms	8			
Forearms	6			
Hands	5			
Posterior trunk	13			
Buttocks	5			
Thighs	19			
Legs	14			
Feet	7			
Groin	1			
Subtotal of lesion BSA				
Weighting factor		×1	×2	×4
Subtotal lesion BSA × weighting factor				

**Tabella VII.** Modified Severity Weighted Assessment Tool. Abbreviazioni: BSA, body surface area; mSWAT, modified Severity Weighted Assessment Tool [22].

Il parametro N indaga l'estensione della patologia ai linfonodi locoregionali. La valutazione biptica dei linfonodi si rende necessaria solo quando questi ultimi abbiano mostrato all'esame obiettivo alterazioni patologiche quali una dimensione maggiore di 1,5cm, fissità ai tessuti circostanti oppure una captazione alla FDG-PET [90].

Vengono utilizzati due differenti modelli per la valutazione del parametro N. Il Dutch system valuta l'interessamento linfonodale dando maggiore rilevanza al riscontro di nuclei cerebriformi di dimensioni superiori a 7,5 $\mu$ m e al sovvertimento dell'architettura linfonodale [91], mentre il sistema NCI-VA attribuisce maggiore importanza al numero di linfociti atipici anziché alla dimensione [92,93].

Il parametro M indica la presenza di metastasi a distanza. Le metastasi vengono ricercate e riscontrate mediante indagini di imaging quali TC e PET-TC del torace, dell'addome, della pelvi e del collo. Una volta rilevate può essere utile eseguire una valutazione della funzionalità d'organo oltre ad una conferma bioptica della malignità della lesione.

Il parametro B rappresenta il coinvolgimento ematico di malattia. Tale parametro viene studiato mediante l'attuazione di completi esami ematochimici, della clonalità del TCR ed una citometria a flusso del sangue periferico per la valutazione di linfociti anomali e della presenza di cellule di Sézary [83]. Il clone a livello sanguigno deve essere comparabile con quello ritrovato a livello cutaneo. La rilevanza dell'individuazione di un clone isolato a livello sanguigno differente rispetto a quello riscontrato a livello cutaneo deve ancora essere determinata [5]. I parametri appena approfonditi della classificazione TNMB della ISCL/EORTC sono riassunti nella tabella sottostante.

TNMB Stages	Description of TNMB
<b>Skin*</b>	
T <sub>1</sub>	Limited patches, papules, and/or plaques covering < 10% of the skin surface; may further stratify into T <sub>1a</sub> (patch only) v T <sub>1b</sub> (plaque ± patch)
T <sub>2</sub>	Patches, papules, or plaques covering ≥ 10% of the skin surface; may further stratify into T <sub>2a</sub> (patch only) v T <sub>2b</sub> (plaque ± patch)
T <sub>3</sub>	One or more tumors (≥ 1 cm diameter)
T <sub>4</sub>	Confluence of erythema covering ≥ 80% body surface area
<b>Node†</b>	
N <sub>0</sub>	No clinically abnormal lymph nodes; biopsy not required
N <sub>1</sub>	Clinically abnormal lymph nodes; histopathology Dutch grade 1 or NCI LN <sub>0-2</sub>
N <sub>1a</sub>	Clone negative
N <sub>1b</sub>	Clone positive
N <sub>2</sub>	Clinically abnormal lymph nodes; histopathology Dutch Grade 2 or NCI LN <sub>3</sub>
N <sub>2a</sub>	Clone negative
N <sub>2b</sub>	Clone positive
N <sub>3</sub>	Clinically abnormal lymph nodes; histopathology Dutch grade 3-4 or NCI LN <sub>4</sub> ; clone positive or negative
N <sub>x</sub>	Clinically abnormal lymph nodes without histologic confirmation or inability to fully characterize the histologic subcategories
<b>Visceral</b>	
M <sub>0</sub>	No visceral organ involvement
M <sub>1</sub>	Visceral involvement (must have pathology confirmation and organ involved should be specified)
<b>Blood</b>	
B <sub>0</sub>	Absence of significant blood involvement: ≤ 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells
B <sub>0a</sub>	Clone negative
B <sub>0b</sub>	Clone positive
B <sub>1</sub>	Low blood tumor burden: > 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells but does not meet the criteria of B <sub>2</sub>
B <sub>1a</sub>	Clone negative
B <sub>1b</sub>	Clone positive
B <sub>2</sub>	High blood tumor burden: ≥ 1,000/μL Sézary cells with positive clone‡; one of the following can be substituted for Sézary cells: CD4/CD8 ≥ 10, CD4+CD7- cells ≥ 40% or CD4+CD26- cells ≥ 30%

**Tabella VIII.** *Revisione della classificazione TNMB della MF/SS. Abbreviazioni: ISCL, International Society for Cutaneous Lymphomas; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; NCI, National Cancer Institute [22,25].*

La classificazione TNMB rende possibile la stadiazione clinica, più utile per avere delle informazioni sia prognostiche che terapeutiche. In generale gli stadi IA-IB-IIA rappresentano lo “stadio precoce” di patologia per il quale, come è possibile desumere dalla tabella, la sopravvivenza globale (OS) è di decenni. La maggior parte dei pazienti presenta questo tipo di stadio alla diagnosi [5]. Gli stadi successivi, dal IIB al IVB, vengono invece definiti come “stadio avanzato” di

patologia: pazienti che rientrano in questa categoria hanno una cattiva prognosi, con una mediana di sopravvivenza inferiore ai 5 anni [5].

La stadiazione della patologia è in continua evoluzione ed una volta effettuata deve essere ripetuta in caso di ricaduta o di progressione della patologia.

Stage	T	N	M	B	Median OS (years)	OS (%)			DSS (%)			RDP (%)			
						5 Years	10 Year	20 Years	5 Years	10 Years	20 Years	5 Years	10 Years	20 Years	
IA	1	0	0	0	0,1	35.5	94	88	73	98	95	90	8	12	18
IB	2	0	0	0	0,1	21.5	84	70	52	89	77	67	21	38	47
IIA	1,2	1	0	0	0,1	15.8	78	52	47	89	67	60	17	33	41
IIB	3	0-2	0	0	0,1	4.7	47	34	21	56	42	29	48	58	71
IIIA	4	0-2	0	0	0	4,7	47	37	25	54	45	31	53	62	74
IIIB	4	0-2	0	1	3,4	3.4	40	25	NR	48	45	NR	82	73	NR
IVA1	1-4	0-2	0	2	3.8	3.8	37	18	15	41	20	17	62	83	86
IVA2	1-4	3	0	0-2	2.1	2.1	18	15	3	23	20	6	77	80	94
IVB	1-4	0-3	1	0-2	1.4	1.4	18	NR	NR	18	NR	NR	82	NR	NR

**Tabella IX.** Staging ISCL/EORTC. Abbreviazioni: OS, overall survival; DSS, disease-specific survival; RDP, risk of disease progression [5].

La prognosi dipende dal tipo e dall'estensione del coinvolgimento cutaneo (BSA), dalla presenza di infiltrazione linfonodale e dalla presenza di patologia viscerale.

È stato osservato che, dei pazienti con patologia in fase precoce, solo il 25% effettivamente progredirà allo stadio avanzato.

I pazienti con MF limitata alla cute hanno una sopravvivenza a 5 anni dell'80-100%. Al contrario, pazienti con coinvolgimento linfonodale presentano una sopravvivenza a 5 anni solamente del 40% [4].

In base allo stadio della patologia, come rilevabile in tabella, la mediana di sopravvivenza varia notevolmente. Secondo un differente studio, i dati sono abbastanza sovrapponibili: la mediana di sopravvivenza in stadio IIB è di 86 mesi, in stadio III circa la stessa, mentre il IV stadio ha una sopravvivenza nettamente inferiore, con una mediana di 48 mesi per il IVA e di 33 per il IVB.

Delle oltre 10 variabili testate, solo quattro di esse hanno dimostrato essere dei fattori indipendenti di prognosi negativa, ovvero: stadio IV, età >60 anni, trasformazione in linfoma a grandi cellule e l'incremento della lattato deidrogenasi (LDH) [4,20,94]. Tali fattori sono stati combinati per creare un indice prognostico di patologia. I gruppi di pazienti così creati presentano una significativa differenza di sopravvivenza a 5 anni: il gruppo con un basso rischio (0-1 fattore positivo) ha una 5y-DSS del 68%, quello con rischio intermedio (2 fattori presenti) del 44%, quello con rischio alto (3-4 fattori positivi) del 28% [94].

Ulteriori studi hanno evidenziato che la prognosi varia a seconda della variante presa in considerazione: si è notato che la MF ipopigmentata e la reticolosi pagetoide hanno un'ottima prognosi, d'altro canto la FMF (5y-DSS del 60%) e la GSS tendono ad avere invece una prognosi peggiore [61,71].

Si è osservato che i pazienti affetti da MF hanno un rischio aumentato rispetto alla popolazione generale di sviluppare altre patologie tumorali ematologiche e non, quali il linfoma di Hodgkin, la papulosi linfomatoide ed altre [93].

### **1.2.9 Terapia**

Nonostante le numerose ricerche genomiche per la ricerca di target molecolari da utilizzare a scopo terapeutico, la MF in stadio avanzato rimane una patologia per cui non esistono terapie definitive efficaci tali da permettere la guarigione [85].

In linea generale il trattamento deve essere adattato allo stadio ed all'estensione della patologia [95–97] e richiede idealmente un team multidisciplinare che includa il dermatologo, l'oncologo, l'ematologo ed il radiologo.



L'approccio terapeutico è sempre più specifico ed individualizzato sul singolo individuo e tiene conto dell'età e del performance status del paziente, dello stadio della malattia, dell'estensione del coinvolgimento cutaneo, della presenza di fattori prognostici negativi elencati nel precedente capitolo e del tipo di terapie pregresse già intraprese [90].

Nell'ultimo consensus da parte di EORTC, ISCL e United States Cutaneous Lymphoma Consortium viene raccomandato l'utilizzo della variazione della mSWAT come parametro di risposta alla terapia. Viene definita come "risposta completa" la guarigione del 100% delle lesioni cutanee, come "risposta parziale" una guarigione tra il 50%-99% senza l'insorgenza di nuovi tumori, "patologia stabile" come una guarigione tra il 25%-50% in assenza di nuove lesioni e una "patologia in progressione" quando le lesioni cutanee aumentano più del 25% o in caso si rilevi la presenza di nuove lesioni tumorali [83].

Attualmente il trattamento prevede inizialmente l'utilizzo di terapie locali singole o in combinazione, seguite da modulatori della risposta biologica e da un uso sempre meno in combinazione e quanto più possibile sequenziale degli agenti chemioterapici.

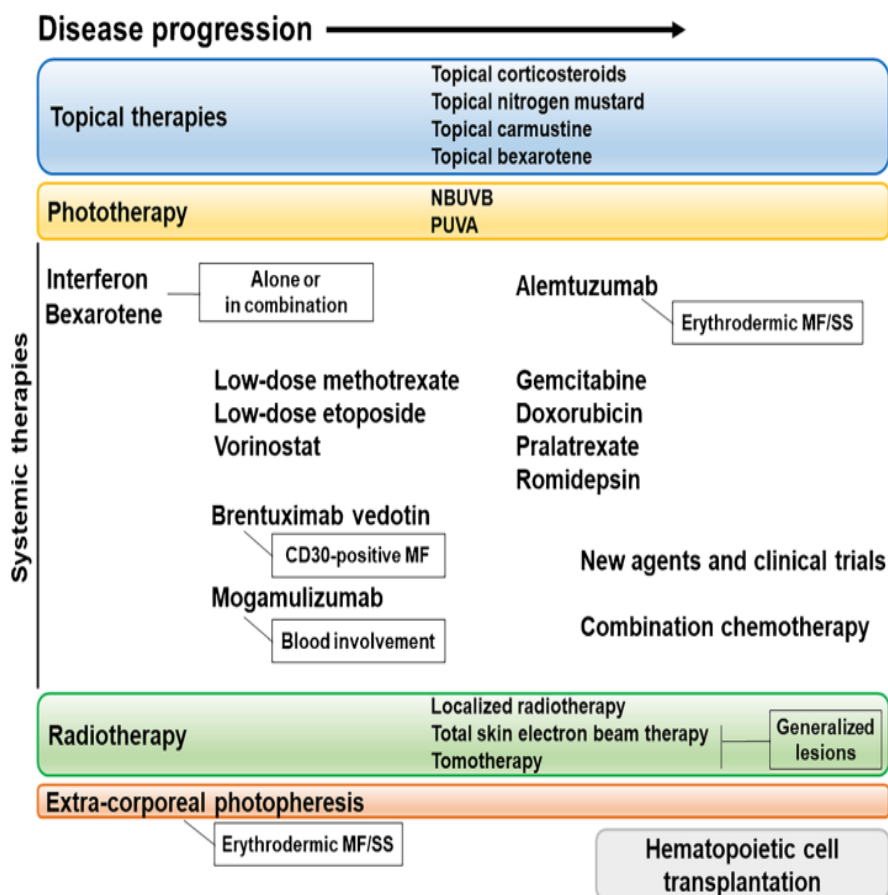


Figura 7. Algoritmo terapeutico per il trattamento della MF avanzata e della SS [95].

## Terapie topiche

Poiché la maggior parte dei pazienti con MF riceve la diagnosi in stadi precoci, l'obiettivo terapeutico è quello di migliorare il quadro patologico e la sintomatologia diminuendo al massimo la tossicità e gli effetti collaterali generati dalle terapie stesse. Si pensi infatti che pazienti in stadio IA hanno un'aspettativa di vita del tutto sovrapponibile ai pazienti sani della stessa età [35].

L'uso sin dalle prime fasi di una terapia combinata aggressiva con terapie locali, radianti e chemioterapici topici non ha portato ad un effettivo beneficio né per quanto riguarda la OS, né per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia oltre a causare numerosi effetti collaterali [96]. In pazienti con massa limitata e con evidenza di lenta progressione può essere impostata una sorveglianza attiva oppure una terapia topica di prima linea.

La terapia di prima linea include principalmente unguenti topici a base di corticosteroidi, mostarde azotate, 8-metossipsolarene in associazione ad irradiazione UV-A (PUVA), irradiazione UV-B a banda stretta (NBUVB – 311nm), interferone- $\alpha$ , retinoidi e rexinoidi, agonisti del TLR, radioterapia locale o una combinazione di queste modalità [97]. Tutte queste terapie inducono l'apoptosi dei linfociti maligni mediante l'induzione di danni al DNA delle cellule tumorali, che essendo in rapida proliferazione risultano irreparabili. La Complete Response Rate (CRR) è compresa tra il 60-100% [52].

Gli steroidi topici hanno dimostrato un'ottima risposta negli stadi iniziali, con minimi effetti collaterali quali atrofia cutanea e lo sviluppo di teleangectasie [52].

Tra le mostarde azotate, attualmente la più utilizzata è la mecloretamina. Le mostarde azotate sono degli agenti alchilanti con effetto antimitotico e con una sicurezza a lungo termine già ampiamente dimostrata [98]. Inoltre non è stato evidenziato alcun assorbimento sistemico e di conseguenza complicanze sistemiche da esso generate se non una dermatite irritativa da contatto [20,99].

Imiquimod e Resiquimod sono dei farmaci innovativi appartenenti alla famiglia delle Imidazoquinoline. Sono degli agonisti dei Toll-like receptor (TLR) che inducono la sintesi ed il rilascio di citochine quali INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 che attivano la risposta immunitaria adattativa ed una maggiore aggressione

tumorale da parte del sistema immunitario. Gli effetti collaterali sono minimi ed includono dolore, eritema, ulcerazione e sintomi sistemici simil-influenzali.

La fototerapia è la terapia standard per i pazienti con MF in stadio precoce non controllata da terapie topiche. Può essere essenzialmente di due tipi in dipendenza della tipologia di lesione: le chiazze possono essere aggredite con raggi UVB a banda stretta (NBUVB), mentre le placche o le chiazze refrattarie vengono trattate utilizzando i raggi UVA in associazione all'8-metilpsolarene (PUVA). Gli effetti collaterali della fototerapia sono il fotodanneggiamento cutaneo e l'aumento rischio di neoplasie cutanee [98].

I retinoidi di prima generazione come l'isotretinoina hanno effetti limitati sulla micosi fungoide. Il retinoide sintetico Bexarotene si lega al Retinoid X Receptor (RXR) con alta selettività e la risposta alla terapia è stata visibile nei pazienti in tutti gli stadi di malattia. Gli effetti avversi più comuni a tale categoria di farmaci sono l'ipertrigliceridemia, l'ipercolesterolemia, la neutropenia e l'ipotiroidismo centrale. Per monitorare gli effetti collaterali i pazienti devono essere sottoposti mensilmente a controlli. Nei pazienti che beneficiano di tale trattamento è opportuno continuare la terapia fino a progressione [27,100–104].

La radioterapia localizzata può essere utilizzata in pazienti con noduli isolati o localizzati o lesioni croniche dolorose che tendono a non rispondere ai sopracitati trattamenti. Questo perché comunemente le cellule di MF sono molto sensibili all'effetto tossico indotto dalle radiazioni. Se le lesioni sono invece diffuse, refrattarie o rapidamente progressive si predilige la *Total Skin Electron Beam Therapy* (TSEBT), probabilmente la più efficace tra le terapie topiche, con una percentuale di risposta completa del 70% secondo i dati più recenti. La TSEBT è usualmente riservata per pazienti con coinvolgimento cutaneo diffuso, per placche estese, per la palliazione della sindrome di Sézary oppure precedente il trapianto di cellule staminali allogeniche non ablativo. Come effetti collaterali si osserva anche in questo caso una maggior predisposizione all'insorgenza di nuove neoplasie cutanee, eritema e perdita dei capelli [105].

La radioterapia dei tumori di grandi dimensioni e refrattari alle terapie impostate sono considerate un'ottima modalità palliativa per migliorare la qualità di vita dei pazienti.

### **Terapie sistemiche**

Per gli stadi avanzati non esiste ad oggi una terapia che conduca alla guarigione. I pazienti, terminato il ciclo di terapia, recidivano frequentemente e necessitano quindi di cure continuative. Benché vi sia una notevole eterogeneità nel trattamento della MF avanzata tra i centri americani e quelli europei, si osserva come i trattamenti maggiormente impiegati prevedono l'utilizzo di retinoidi, di inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC), dell'interferone, della fotoferesi extracorporea (ECP), degli anticorpi monoclonali, della chemioterapia sistemica e del trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Nonostante la varietà di terapie sistemiche ad oggi disponibili, la risposta clinica è spesso breve e l'unica opzione curativa risulta essere il trapianto di cellule staminali ematopoietiche [106,107]. Ciononostante, la MF rimane una patologia incurabile nella stragrande maggioranza dei pazienti e rimane attuale la necessità di una continua ricerca di trattamenti innovativi e più efficaci.

Gli inibitori dell'istone-deacetilasi (iHDAC) hanno un ruolo nella diminuzione della trascrizione di proteine necessarie per la carcinogenesi tramite un meccanismo di repressione epigenetica. Attualmente i due farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) sono il Vorinostat e la Romidepsina. Tra gli effetti indesiderati riportati vi sono gastropatie e pancitopenie. Raramente è stato osservato anche un aumento dell'intervallo QT. Alla luce di ciò risulta necessario monitorare i pazienti mediante la prescrizione di elettrocardiogrammi ripetuti.

Tra tutti gli interferoni quello più studiato è l'IFN- $\alpha$ . L'interferone- $\alpha$  ha mostrato effetti pleiotropici all'interno dell'ambiente tumorale, permettendo di riportare la risposta immunitaria verso il tipo Th1 tipico delle fasi iniziali dei CTCL [108]. La risposta a tale farmaco è graduale e sono necessari da 3 a 6 mesi per ottenere la massima risposta. Per la sua buona efficacia e discretamente bassa tossicità viene scelto come trattamento di prima linea negli stadi avanzati di MF. In caso di mancata risposta si può optare per una terapia di combinazione associandolo alla maggior parte dei trattamenti utilizzati comunemente nelle fasi avanzate [90].

La tossicità a lungo termine che più desta preoccupazione è quella neurologica con il rischio di depressione, neuropatia, demenza e mielopatia; altri effetti tossici si hanno a livello di fegato, tiroide e midollo osseo [90,107].

La fotoferesi extracorporea (ECP) prevede l'esposizione di una porzione di plasma del paziente con 8-metossipsolarene in presenza di luce UVA all'interno di un circuito extracorporeo, seguito dalla reinfusione delle cellule irradiate. Il trattamento sfrutta la fotoreattività dello psolarene che si lega covalentemente al DNA quando esposto ai raggi UVA portando all'apoptosi della maggior parte dei linfociti ed inducendo una risposta immunitaria contro il tumore [48]. Tale terapia è raccomandata in prima linea per la MF eritrodermica e per la SS [109].

Il trattamento è eseguito per via intravenosa e prevede che il paziente rimanga disteso per circa 3 ore. Il piano terapeutico prevede due sedute in due giorni consecutivi ogni 4 settimane [90]. Il 25% circa dei pazienti ha una risposta completa, la stessa percentuale non ha risposta, mentre un 50% presenta una risposta parziale. Gli effetti indesiderati di tale trattamento sono pochi ed il più frequentemente riportato è l'anemia sideropenica [110].

La target-therapy è sempre più utilizzata per trattare la malattia in fase avanzata come alternativa all'approccio chemioterapico. Gli anticorpi monoclonali hanno mostrato risultati promettenti e rappresentano una valida alternativa terapeutica nelle MF in stadio avanzato. L'*Alemtuzumab* è un anticorpo monoclonale umanizzato contro CD52, espresso dalla maggior parte dei linfociti T, B e NK. La percentuale di risposta varia tra il 50-70% ed è maggiore nei pazienti affetti da SS, il che farebbe propendere verso un maggiore effetto dello stesso a livello delle cellule circolanti [56]. Poiché il trattamento può portare alla riattivazione del citomegalovirus, *Pneumocystis jirovecii* ed altre infezioni opportunistiche, questo è utilizzato solamente in pochi pazienti nonostante la sua ottima efficacia [107].

*Brentuximab-Vedotin* è un anticorpo monoclonale anti-CD30 coniugato con un farmaco antimitotico antitubulare. Gli anticorpi monoclonali che interagiscono con il CD30 inducono apoptosi tramite l'attivazione della via di segnale a valle del CD30. La risposta globale è stata intorno al 70% dei pazienti. L'effetto collaterale più importante è l'induzione di neuropatia periferica nella maggior parte dei casi reversibile, oltre ad astenia, nausea, alopecia e neutropenia [52].

Il *Mogamulizumab* è un anticorpo anti-CCR4. In aggiunta al suo ruolo di regolazione del *homing* e *trafficking* cellulare, il coinvolgimento del CCR4 promuove anche la crescita e la sopravvivenza cellulare [52]. Non presentando importanti effetti collaterali è indicato nei pazienti in cui le terapie di prima linea non abbiano sortito effetto [90].

La chemioterapia sistemica convenzionale porta solitamente a buoni risultati a fronte però di una elevata tossicità, ma le recidive sono la regola. La recidiva di malattia si ha infatti in quasi il 90% dei pazienti entro il primo anno dal termine del ciclo chemioterapico. Recenti studi hanno dimostrato addirittura un aumento della mortalità se essi vengono utilizzati in prima linea ed è per questo che vengono preferite altre terapie [111]. I chemioterapici maggiormente utilizzati sono la gemcitabina, la doxorubicina liposomiale, il pralatrexato e la romidepsina.

La gemcitabina è un analogo nucleosidico della deossicitidina ed inibisce la sintesi del DNA. La risposta avviene in circa il 70% dei pazienti e la mediana di durata è di 15 mesi. Può essere anche usata in combinazione con il Bexarotene nella terapia di mantenimento e può essere alternata alla doxorubicina liposomiale per prolungare la durata complessiva della chemioterapia. Gli effetti avversi riguardano prevalentemente la funzione del midollo osseo con leucopenia, anemia e trombocitopenia.

La doxorubicina peghilata liposomiale è una nuova formulazione che permette un maggiore accumulo a livello tissutale rispetto alle formulazioni precedenti. La risposta al farmaco è del 48%.

Il pralatrexato è un nuovo antifolato con alta affinità per il carrier dei folati. È stato associato ad una risposta globale del 29% in pazienti con recidiva o linfoma T periferico refrattario alle altre terapie. Nel tentativo di ridurre l'incidenza di mucositi, l'acido folico e la vitamina B12 vengono sistematicamente somministrate [112].

Vi è indicazione alla chemioterapia nei pazienti con malattia bulky, con ingente coinvolgimento linfonodale o viscerale, in patologie rapidamente progressive o refrattarie alle terapie di prima linea [113].

Il paziente può essere trattato in mono o in polichemioterapia. In considerazione degli elevati effetti collaterali di tali sostanze, prima fra tutte la mielosoppressione, viene di gran lunga preferita la monochemioterapia. La

polichemioterapia prevede diversi schemi terapeutici in comune con altre patologie ematologiche, tra cui EPOCH (etoposide, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamide in bolo e prednisone per via orale), CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, e prednisone), CVP (ciclofosfamide, vincristina e prednisone) [114,115].

Buoni risultati sono stati ottenuti in molti pazienti con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche. Nonostante l'elevata tossicità (si stima infatti un 25-30% di mortalità) questo trattamento è promettente e l'unico potenzialmente curativo per gli stadi avanzati di patologia, maggiormente nei pazienti che non sono stati adeguatamente pretrattati. Il meccanismo d'azione che spiega l'efficacia di questo trattamento è la graft-versus-lymphoma (GvL), ed è per questo che il trapianto allogenico si è dimostrato molto più efficace del trapianto autologo [116].

### **Terapia di mantenimento**

Solitamente, una volta raggiunta la remissione, la fase di mantenimento viene effettuata con dosi e frequenza di terapia minore.

Terapie di mantenimento descritte sono la PUVA, l'applicazione topica di mostarde azotate, la fotoferesi extracorporea (ECP) e l'utilizzo di IFN- $\alpha$ . Una caratteristica di questa fase è il coinvolgimento e l'esposizione della cute sana come componente integrante nel raggiungimento della remissione. Questo successo riflette l'abilità della terapia di interrompere la fase di reclutamento cutaneo delle cellule tumorali circolanti.

La guarigione viene definita come un intervallo di tempo libero da malattia di almeno 8 anni. Infatti, dallo studio dei follow up dei pazienti trattati, emerge che dopo un periodo di 5-8 anni le recidive tardive sono estremamente rare [98,117].

In caso di recidiva di patologia successiva a remissione, il processo di attivazione e reclutamento delle cellule T può essere rallentato e smorzato dall'utilizzo aggressivo di glucocorticoidi topici.

### 1.3 Lo zebrafish come modello in dermatologia

I modelli animali hanno permesso, sin dall'inizio del loro utilizzo, di effettuare studi che altrimenti non potevano essere intrapresi in individui umani. Essi rappresentano una parte fondamentale della ricerca scientifica, consentendo di ottenere delle indicazioni utili sulla fisiologia e sulla patofisiologia umana, ma anche di effettuare studi avanzati di farmacocinetica e farmacodinamica finalizzati allo sviluppo di nuovi trattamenti per numerose patologie.

Fra i modelli animali più utilizzati nelle ricerche mediche ricordiamo i modelli murini o relativi ad altri mammiferi, in virtù delle similitudini fisiologiche e genetiche con gli umani. Negli ultimi anni, tuttavia, altri modelli animali stanno dimostrando vantaggi distintivi e specifici rispetto ai modelli convenzionali. Quello che si è rivelato fra i più importanti modelli vertebrati non mammiferi per le ricerche mediche è lo zebrafish (*Danio rerio*). Questa importanza risiede nell'elevato livello di similarità del suo genoma con quello umano e nella caratteristica di sviluppare spontaneamente pressoché qualsiasi tipo di tumore [118–120]. A tale riguardo si evidenzia come la progressione tumorale in questi animali ripercorra molti aspetti delle patologie umane ed apra le porte per lo studio e l'identificazione dei fattori chimici e genetici alla base del cancro [118,121–124]. Questo vale anche per la pelle di tale organismo, che evidenzia molte similarità con la cute umana. Pertanto, questo modello appare particolarmente adeguato per poter studiare patologie umane cutanee sia infiammatorie che neoplastiche.

Vedremo nel seguito come l'utilizzo del modello zebrafish in combinazione con l'aumentata efficienza dei test farmacologici e delle proprietà di imaging consenta di visualizzare la progressione del cancro e dell'angiogenesi in vivo.

Fra le caratteristiche che rendono questo modello animale altamente fruibile per la ricerca medica ricordiamo il basso costo di mantenimento, l'elevata fecondità e lo sviluppo embrionale *ex utero* che permette di ottenere interessanti immagini *in vivo*.



### 1.3.1 Lo zebrafish

*Danio rerio* (Hamilton 1822), conosciuto nel mondo biomedico come Zebrafish, è stato introdotto come modello sperimentale per studi genetici dal ricercatore G. Streisinger durante gli anni '80 del secolo scorso [125]. Si tratta di un pesce tropicale vertebrato di piccole dimensioni ampiamente diffuso in habitat di acqua dolce. La piccola taglia, il basso costo di mantenimento, l'elevata fecondità, con una capacità di produrre dalle 200-300 uova per evento riproduttivo, oltre che la rapidità e trasparenza dello sviluppo *ex utero*, sono considerati i più rilevanti vantaggi nell'utilizzo di tale organismo modello per l'osservazione dello sviluppo precoce sia fisiologico che patologico direttamente in vivo [126].

Un'evoluzione del modello classico di zebrafish è avvenuta con la produzione del “*casper mutant*”, ovvero uno zebrafish mutante che mantiene la trasparenza per tutta la vita e non solamente nel primo mese di vita. Tale modello, utilizzato anche per gli studi di trapianto in vivo [127,128], permette di ottenere delle immagini dirette della progressione tumorale, inclusi l'invasione cellulare, l'entrata e l'uscita dai vasi sanguigni ed il processo di neoangiogenesi [128,129], oltre che avere un potenziale nello screening in vivo di nuove terapie.



*Figura 8. Comparazione della differenza di trasparenza fra uno zebrafish wild-type normalmente pigmentato in basso ed il mutante di zebrafish casper in alto [130].*

In effetti, la caratteristica degli zebrafish embrionali di assorbire efficacemente piccole molecole direttamente dall'acqua in cui vivono li rende particolarmente interessanti per lo screening sia di molecole cancerogene che di agenti antitumorali [131,132]. Inoltre, gli screening farmacologici beneficiano della trasparenza degli embrioni nonché degli alti rendimenti dei saggi, visto che imaging, analisi cellulari e calcoli statistici possono essere intrapresi simultaneamente in un altissimo numero di pesci, con lo spazio del laboratorio come unico fattore limitante [133]. Ciò permette di comprendere il ruolo potenziale dello zebrafish come ponte tra i saggi cellulari e la validazione biologica di determinate sostanze.

L'analisi genetica è di facile esecuzione, avvalendosi di numerosi pesci mutanti o pesci transgenici tessuto-specifici prodotti e ad oggi disponibili [118,121–124].

Da un punto di vista genetico si riscontra in tale modello un'elevata similarità fra il suo genoma e quello umano. Recenti studi, infatti, stimano che circa il 70% dei geni umani abbia effettivamente almeno un gene ortologo in zebrafish. Questi dati

sono sorprendenti, specialmente considerando che i topi condividono circa l'80% del loro genoma con gli umani [126,134].

Limitatamente ai geni malattia umani conosciuti, si può affermare che oltre l'80% abbia un ortologo negli zebrafish, inoltre risultano conservate molte vie di segnale cellulari.

Ricordiamo inoltre che il modello zebrafish è stato ad oggi sfruttato anche per studi genetici finalizzati all'osservazione di un determinato fenotipo a partire da un genotipo noto oppure, al contrario, all'identificazione di uno specifico genotipo a partire da un fenotipo conosciuto [135].

Gli studi condotti in zebrafish sono in grado di analizzare, rispetto ai modelli murini, un maggior numero di fenotipi e di ridurre i costi ed il lavoro. Negli studi farmacologici fenotipo-guidati, la presenza di alterazioni fenotipiche in tutto l'organismo suggerisce l'efficacia del trattamento anche se il target è sconosciuto. Questo approccio aiuta sia lo sviluppo di nuovi farmaci sia la simultanea identificazione dei meccanismi molecolari sottostanti la patologia e che inducono quello specifico fenotipo [136].

Benché, come qui evidenziato, questo modello sia estremamente versatile nella ricerca medica e farmacologica, sono stati segnalati alcuni inconvenienti. Primo tra tutti il fatto che lo zebrafish necessita per sopravvivere di essere allevato in un ambiente dotato di una temperatura costante di 28°C. Questo differisce notevolmente dalla temperatura omeostatica dei mammiferi ed ostacola studi in cui la temperatura è un fattore determinante. Tali pesci possono però tollerare delle variazioni di temperatura molto ampie che variano tra i 6°C ed i 38°C per tempi limitati. Un'altra caratteristica negativa è data dal fatto che la duplicazione del genoma teleosteo comporta la presenza di geni in più di una copia (paraloghi) che potrebbe in alcuni casi complicare lo sviluppo di studi molecolari e genetici. Un altro svantaggio è la mancanza di disponibilità di anticorpi che abbiano come bersaglio le proteine dello zebrafish [1-3].

Riassumendo, nonostante i modelli murini rimangano attualmente i più usati nella ricerca, gli zebrafish hanno dimostrato diversi vantaggi e caratteristiche uniche rispetto ai sistemi mammiferi, che possono giustificare il loro ruolo ancillare e complementare nell'ambito della ricerca medica.

### 1.3.2 La cute dello zebrafish

La cute dei pesci, come la cute dei mammiferi, è costituita da tre diversi strati, che sono, in ordine di superficialità: l'epidermide, il derma e l'ipoderma.

La differenza fra le due specie si evidenzia però nella struttura dell'epidermide: mentre l'epidermide dei vertebrati terrestri è ricoperta da uno strato esterno costituito da cellule cheratinizzate morte, la pelle dei teleostei è composta di cellule vive ricoperte di muco e dall'assenza di un vero e proprio rivestimento corneo [137]. Inoltre, a quest'ultima mancano degli annessi cutanei quali follicoli piliferi e ghiandole sebacee.

L'epidermide dei mammiferi è un tessuto altamente organizzato e diviso in cinque diversi strati che sono, partendo dalla membrana basale fino all'epidermide, lo strato basale, lo spinoso, il granulare, il lucido e lo strato corneo. L'epidermide dei teleostei è invece suddivisa negli strati superficiale, intermedio e basale.

Lo strato superficiale è formato da cellule singole disposte in microcreste nella superficie più esterna. Le cellule che compongono tale strato sono ricche di filamenti di cheratina e non producono uno strato corneo ma vengono individualmente rimpiazzate una volta morte.

Lo strato intermedio è composto da differenti tipi cellulari, incluse ghiandole unicellulari, cellule sensoriali, ionociti e cellule indifferenziate.

Lo strato basale è uno strato unicellulare adeso alla membrana basale tramite particolari giunzioni di ancoraggio: gli "emidesmosomi", fondamentali per garantire un saldo legame fra l'epidermide ed il derma [138].

La cute dello zebrafish presenta un rapido tasso maturativo dallo stadio embrionale fino all'organismo completamente maturo.

Gli strati rappresentanti l'epidermide ed il derma sono rilevabili già il giorno successivo alla fecondazione (*day post fertilisation*, dpf). Al 6° dpf, quest'ultima è composta da un duplice strato, mentre nel pesce adulto completamente maturo vi è un'epidermide multistrato separata dallo stroma collagenosico dalla membrana basale. Negli individui adulti, l'epidermide è ricoperta da scaglie che si sviluppano a partire dal 30° dpf seguendo una cascata genetica che include l'espressione di *sonic hedgehog* [139].

Oltre alle cellule fibroblastiche adiacenti allo stroma collagenosico, la cute dello zebrafish presenta delle cellule pigmentate derivate dalla cresta neurale, costituite da melanociti.

### **1.3.3 Infiammazione cutanea**

Gli zebrafish sono animali poichilotermi, ovvero animali la cui temperatura varia con quella del loro ambiente, e per questa caratteristica si differenziano dagli esseri umani che sono omeotermi, ovvero hanno una temperatura interna relativamente stabile. Tale caratteristica comporta che piccoli cambiamenti nei parametri ambientali rendono gli zebrafish vulnerabili a qualsiasi forma di danno esterno oltre a renderli più suscettibili all'infiammazione.

La cute del pesce rappresenta la prima linea di difesa ed è composta da cellule residenti non immunitarie, da cellule epiteliali, da cellule epiteliali mucose e da cellule vascolari endoteliali che hanno tutte il compito di allertare il sistema immunitario in caso di danno e di regolare la corretta risposta infiammatoria. A differenza della cute umana, i pesci mancano di un vero e proprio accumulo di cellule linfoidi a livello cutaneo. Vi sono poche informazioni concernenti la posizione naturale delle cellule linfoidi nella cute dei pesci e di come queste vengano reclutate nel corso dell'infiammazione o nelle reazioni immunitarie. Tuttavia, pare che la maggior parte dei leucociti possa migrare come risposta a qualsiasi tipo di insulto tramite le secrezioni mucose.

I più importanti meccanismi infiammatori dei pesci si sono dimostrati simili a quelli umani. Dato l'alto grado di somiglianza nel funzionamento immunitario tra i mammiferi ed i pesci, il ruolo di NF- $\kappa$ B nella modulazione dell'espressione e nel rilascio delle citochine proinfiammatorie è cruciale sia nei pesci che nei mammiferi [140]. La regolazione della risposta immunitaria nei vertebrati è relativamente ben conservata e le citochine proinfiammatorie classiche, incluse l'IL-1 $\beta$ , il TNF- $\alpha$  e l'IL-6, prevalgono come paraloghi (a copie multiple) nella maggior parte dei teleostei [141]. In entrambe le specie, i neutrofili raggiungono le zone maggiormente infiammate tramite i vasi e secernono chemochine con il compito di attivare le cellule residenti, che a turno recluteranno più leucociti nella zona danneggiata e amplificheranno in questo modo l'infiammazione.

Da rilevare come nei pesci, in assenza di midollo osseo e di linfonodi, sia il rene a vicariarne le funzioni agendo come organo linfoide oltre che da organo ematopoietico. Il timo, la milza e i tessuti linfoide associati alle mucose (MALT) sono presenti in entrambe le specie, anche se i mammiferi presentano, rispetto ai pesci, una maggiore quantità di leucociti residenti a livello tissutale.

Numerosi studi hanno analizzato la guarigione delle ferite e la riepitelizzazione in seguito ad un trauma, dimostrando come negli zebrafish vi sia un rapido processo di riepitelizzazione, migrazione in situ delle cellule infiammatorie in seguito all'insulto, formazione di tessuto di granulazione costituito da macrofagi, fibroblasti, vasi sanguigni e collagene con una rapida regressione del tessuto di granulazione e minimi esiti cicatriziali. Le fasi maggiori ed i principi della guarigione cutanea sembrano essere gli stessi fra i mammiferi adulti ed i pesci e questo rende lo zebrafish un valido modello per lo studio della riparazione cutanea nei vertebrati.

Per la somiglianza nella struttura dei tegumenti, lo zebrafish rappresenta un modello conveniente ed economico che può essere applicato per esplorare i meccanismi patologici di numerose patologie cutanee umane.

### **1.3.4 Zebrafish come modello in oncodermatologia**

Uno dei più grandi ostacoli nel campo oncologico è sempre stato l'affrontare l'eterogeneità tumorale sia interindividuale che intratumorale. Le innovazioni nella ricerca del cancro hanno largamente beneficiato di precedenti studi sui processi patologici in animali in vita, cercando di identificare e di andare a colpire le più frequenti mutazioni come razionale approccio al trattamento. Ad esempio, lo xenotrapianto di cellule tumorali derivate da paziente (patient-derived xenotransplantation, PDX) può aiutare nello studio di pazienti resistenti al trattamento a causa di mutazioni addizionali nelle cellule tumorali.

Ai fini di uno screening farmacologico su larga scala è significativa la scelta del modello. Mentre nei modelli murini è necessaria una forte immunosoppressione, ciò non avviene nei modelli non mammiferi come i pesci in cui questa è immatura o del tutto assente. Data questa caratteristica, insieme all'elevata conservazione delle principali vie cancerogene intracellulari in comparazione agli umani, lo zebrafish ha recentemente attirato l'attenzione degli studiosi. Esso è un modello

versatile dal punto di vista genetico ed è possibile operare una mutazione in geni specifici, ottenendo un transgene stabile, oppure indurre una transiente iperespressione o al contrario un silenziamento in specifici geni.

Come descritto inizialmente, gli zebrafish sono stati utilizzati per testare l'efficacia di determinati mutageni chimici nello sviluppo delle neoplasie. Attualmente le tecniche di manipolazione genetica più utilizzate sono gli oligomeri morfolino (MOs), le nucleasi zinc finger (ZFNs), le transcriptor activator-like effector nucleases (TALENs) e il sistema CRISPR (cluster regularly interspaced short palindromic repeats). Inoltre, nuove promettenti tecniche, quali la TEAZ (transgene electroporation in adult zebrafish) e la PDX (patient-derived cancer cell xenotransplantation), sono state recentemente introdotte per essere utilizzate negli zebrafish, dimostrando di poter superare varie problematiche connesse alle precedenti tecniche.

La PDX prevede il trapianto di cellule da un donatore ad un recipiente della stessa specie (allograpianto) o di specie differente (xenotrapianto). Nel caso degli xenotrapianti si sfrutta la trasparenza ottica degli zebrafish, che permette la visualizzazione della propagazione e dell'invasività delle cellule tumorali trapiantate [142,143].

Molti studi hanno dimostrato che negli embrioni di zebrafish possono essere innestate cellule umane tumorali per poter ottenere preziose informazioni sulla patogenesi della malattia.

Per quanto riguarda lo xenotrapianto, gli zebrafish presentano, come già precedentemente evidenziato, alcuni vantaggi rispetto ai modelli murini, quali l'elevata fertilità che permette di ottenere in poco tempo un alto numero di embrioni, trasparenti e privi di un sistema immunitario maturo. Tali embrioni possono essere di conseguenza trapiantati con cellule tumorali e monitorati nel tempo. Data la trasparenza, è possibile osservare in vivo le interazioni cellula-cellula che si vengono via via ad instaurare nel tempo. Inoltre, il PDX negli zebrafish può aiutare nella ricerca di nuovi target e nei trattamenti anti-cancro specifici. C'è evidenza che la ricerca pre-clinica in modelli come questo potrebbe abbreviare il tempo dell'approvazione di un farmaco mantenendo invariati gli standard di efficacia e sicurezza.

Gli zebrafish hanno inoltre mostrato di essere un modello affidabile per valutare l'efficacia e la sensibilità di un farmaco perché in molti esperimenti le cellule

derivate dai pazienti rispondevano efficacemente agli stessi farmaci che erano realmente utilizzati nei pazienti.

Oltre che negli embrioni di zebrafish, le cellule cancerogene derivanti da numerose specie e/o tessuti differenti possono essere introdotte anche in zebrafish più maturi a 30 dpf [129,142]. Entrambi i modelli di trapianto hanno i loro specifici vantaggi e limitazioni nella comprensione dei comportamenti delle cellule cancerose in vivo.

Il trapianto di cellule in uno zebrafish di 30 giorni consente di investigare le dinamiche della formazione della massa tumorale e l'angiogenesi in animali vivi utilizzando una microscopia confocale ad alta risoluzione [129]. Un altro vantaggio nell'utilizzo di pesci giovani rispetto agli embrioni in sviluppo è dato dal fatto che la maggior parte degli organi, inclusi i tessuti vascolari, sono completamente sviluppati ed hanno raggiunto il loro assetto maturo: questo rende più facile l'interpretazione degli effetti vascolari indotti dal tumore ed elimina i problemi legati alla perturbazione del processo di sviluppo [144]. Una limitazione invece è data dal fatto che gli zebrafish di 30 giorni hanno un sistema immunitario funzionale e che deve essere chimicamente soppresso con immunosoppressori, come il desametasone, per poter ottenere un ottimale attecchimento, mentre negli embrioni questo passaggio non è necessario.

Il trapianto di cellule umane tumorali in stadio precoce da 6 a 48 ore post fertilizzazione può rilevare importanti informazioni in merito alla biologia del cancro e ciò è riportato da molti gruppi di studio [142,145]. Questo modello crea un sistema in vivo in cui i vantaggi della coltura di cellule tumorali umane si combinano con la trasparenza degli embrioni di zebrafish, in cui lo sviluppo può essere osservato in tempo reale.

Un studio del 2006 ha mostrato che cellule di melanoma aggressivo sono in grado di indurre uno sviluppo della testa anomalo se trapiantati negli embrioni di zebrafish di 3 ore, e questo è stato dimostrato essere associato all'alterazione della via di segnale *Nodal* [145].

Riassumendo, il vantaggio maggiore nell'uso dello zebrafish allo stadio embrionale/larvale è dato dal fatto che il sistema immunitario è ancora immaturo e questo permette l'attecchimento delle cellule tumorali umane.



Pertanto, l'uso degli zebrafish come un modello di screening preclinico per PDX potrebbe rivoluzionare il nostro approccio al cancro, specialmente nella prospettiva di una medicina sempre più personalizzata e ciò spiega la crescita di interesse verso gli studi di PDX negli zebrafish.

La grande varietà di tipologie di cancro riprodotte con successo in questa specie prova che questo animale modello ha una grande potenzialità nell'analisi di molti tipi differenti di cancro umani.

I modelli genetici di cancro negli zebrafish includono il tumore della guaina dei nervi periferici (PNST), il rhabdomyosarcoma (RMS), il melanoma, i cancro tiroidei, cancro pancreatici, il cancro epatocellulare (HCC), i tumori intestinali, i tumori testicolari, la leucemia linfoide acuta T-cellulare (T-ALL), la leucemia mieloide acuta e cronica (AML e CML), la sindrome mielodisplastica (MDS).

È interessante notare che lo zebrafish ha dimostrato di essere un modello attendibile per il PDX di alcuni cancro che si sviluppano in organi che non sono presenti nei pesci come i polmoni, la prostata e la mammella. Inoltre, è stato dimostrato essere anche un buon modello per lo studio della patogenesi di tumori rari come il sarcoma di Ewing.

Con riferimento alle patologie squisitamente dermatologiche, i modelli di zebrafish in cui è stata utilizzata la tecnica dello xenotrapianto hanno riguardato il carcinoma squamocellulare orale ed il melanoma [142].

Nella tabella sottostante possiamo trovare le caratteristiche generali dei vari modelli di zebrafish ad oggi ottenuti con le diverse tecniche poc' anzi citate.

<b>Tipo di modello</b>	<b>Uso primario</b>	<b>Imaging in vivo</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Carcinogenesi chimica</b>	Screening sull'effetto carcinogenetico dei composti chimici	Osservazione tumorale a basso ingrandimento, l'analisi dettagliata dei tumori è limitata ai campioni tissutali fissati	Modello facile da allestire; non sono necessari specifici ceppi o strumentazioni	Bassa incidenza, sviluppo tumorale ritardato; eterogeneità sia nella localizzazione sia nel tipo di tumori sviluppati
<b>Linee mutanti</b>	Screening per sostanze modificatrici della progressione tumorale da un	Osservazione tumorale a basso ingrandimento; l'analisi dettagliata dei	Elevata incidenza tumorale; omogeneità nella tipologia di tumori formati	Necessità di avere linee di pesci specifiche; molte delle linee mutanti sono difficili da mantenere

punto di vista  
chimico o  
genetico

tumori è  
limitata ai  
campioni  
tissutali fissati

<b>Linee transgeniche</b>	Studio della genesi e della progressione di specifici tipi di cancro	L'espressione di transgeni può essere marcata con fluorescenza. La visualizzazione in vivo ad alta risoluzione è possibile	Alta incidenza di tumori; capacità di indurre una tipologia di tumore tessuto o organo specifico; l'iniziazione tumorale può essere temporalmente controllata	Vi è la necessità di sviluppare linee di pesci transgeniche; alcune linee transgeniche possono essere difficili da allevare o sono instabili. Mancanza di promotori specifici
<b>Xenotrapianto a 2-5 dpf</b>	Studio delle interazioni fra le cellule tumorali e lo stroma	Le cellule iniettate sono marcate con proteine fluorescenti. La visualizzazione in vivo ad alta risoluzione è possibile	Non è richiesta l'immunosoppressione. Una grande quantità di animali possono essere trapiantati contemporaneamente. Il numero e la localizzazione delle cellule trapiantate è controllato. Le cellule tumorali possono essere facilmente modificate geneticamente prima di essere trapiantate	Le cellule tumorali trapiantate sopravvivono solamente per pochi giorni. Molti organi e sistemi (come il sistema vascolare) sono ancora in fase di sviluppo. Non possono essere propagati come linea
<b>Xenotrapianto a 30 dpf</b>	Studio delle interazioni tra le cellule tumorali e le cellule endoteliali degli zebrafish	Le cellule iniettate sono marcate con proteine fluorescenti. La visualizzazione in vivo ad alta risoluzione è possibile	Una grande quantità di animali possono essere trapiantati contemporaneamente. Il numero e la localizzazione delle cellule trapiantate è controllato. Le cellule tumorali possono essere facilmente modificate geneticamente prima di essere trapiantate. Tutti gli organi ed i sistemi animali sono completamente maturi	I pesci richiedono di essere immunosoppressi o in stadio embrionale per poter essere utilizzati; le cellule tumorali sopravvivono nel pesce solamente per poche settimane. Non possono essere propagati come linea

**Tabella X.** Caratteristiche generali dei diversi tipi di modelli di zebrafish. Dpf, day post fertilisation.[130].

I mutageni chimici sono stati il primo approccio per indurre artificialmente i tumori negli zebrafish. I carcinogeni chimici solubili possono essere aggiunti direttamente nell'acqua dei pesci venendo gradualmente assorbiti. Si è notato che

buona parte dei composti chimici carcinogeni per i mammiferi lo sono anche per gli zebrafish [121,123,124]. La maggior parte dei tumori insorti con tale tecnica sono tumori epatici, ma possono anche includere altri organi e tessuti quali la cute (papillomi), i muscoli (rhabdomyosarcoma e leiomyosarcoma), i vasi (emangiosarcoma), il testicolo (seminoma) ed il pancreas (carcinoma pancreatico) [146–148].

Le basi istologiche e molecolari delle neoplasie chimicamente indotte mostrano una similarità significativa con i cancro umani, includendo un'aumentata proliferazione cellulare, una morfologia nucleare atipica e un basso grado di differenziamento cellulare [149]. Tutti questi meccanismi presi nel loro complesso suggeriscono che i meccanismi alla base della carcinogenesi siano altamente conservati tra queste due specie.

La carcinogenesi chimica è molto vantaggiosa per lo studio della biologia tumorale, per l'elevata semplicità di questa metodica ma anche che per il suo basso costo. La crescita tumorale in queste condizioni rappresenta lo sviluppo tumorale spontaneo all'interno del proprio microambiente. Gli svantaggi includono una bassa incidenza di sviluppo tumorale, in genere inferiore al 10%, un'insorgenza tumorale tardiva e l'eterogeneità sia per quanto riguarda il background genetico sia per quanto riguarda l'effettiva localizzazione.

Un ulteriore modello è rappresentato dalle linee mutanti. La possibilità di effettuare uno screening genetico su larga scala negli zebrafish risulta possibile utilizzando le linee mutanti che sono caratterizzate da un'aumentata incidenza di neoplasie spontanee ed un'alta sensibilità ai trattamenti chemioterapici [150,151]. Questi mutanti possono essere divisi in due gruppi, il primo con mutazioni in geni oncosoppressori quali *p53*, *APC*, *PTEN* ed altri, mentre il secondo gruppo presenta mutazioni in geni che non sono, ad oggi, associati a specifiche condizioni tumorali.

La maggior parte di questi mutanti sono letali in omozigosi e pertanto devono essere mantenuti in una popolazione eterozigote. Le caratteristiche principali che differenziano questo modello da quello selvatico sono l'alta incidenza di tumori e il fatto che ognuna di queste linee mutanti mostri una predisposizione verso un ben definito tipo tumorale. Ad esempio, la linea mutante di *p53* sviluppa prevalentemente tumori delle guaine mieliniche periferiche [150].

Come per il modello selvatico, la documentazione della progressione tumorale e delle avvenute metastasi nelle linee cellulari mutanti sono limitate all'analisi istologica dei tessuti fissati o da campioni tissutali che precludono di conseguenza il monitoraggio in vivo di questi processi dinamici nel tempo.

È possibile incrociare questi mutanti con i mutanti casper che sono in grado di mantenere la trasparenza anche da adulti o con zebrafish transgenici che esprimono delle proteine fluorescenti tessuto-specifiche: questo permette la visualizzazione diretta della progressione tumorale e delle metastasi a distanza utilizzando la microscopia in fluorescenza [152,153].

Un vantaggio della genetica degli zebrafish è dato dal fatto di poter esprimere geni di interesse quali oncogeni o forme mutanti di geni oncosoppressori in particolari organi o tessuti tramite l'utilizzo di promotori tessuto-specifici. Oltre a ciò, i geni possono essere ingegnerizzati per esprimere varie forme di proteine fluorescenti. Questo permette la selezione di linee transgeniche stabili ed il monitoraggio in vivo della progressione tumorale tramite la microscopia in fluorescenza [123,154].

Lo xenotrapianto di cellule umane è stato per molti anni lo strumento principale utilizzato dai bio-oncologi. Recentemente lo zebrafish è emerso come nuovo modello animale in cui utilizzare questa tecnica, dimostrando particolare efficacia nello studio del rimodellamento vascolare, dell'invasione tumorale e della formazione di metastasi.

L'abilità di propagare le cellule cancerogene umane nei pesci ha tre grandi vantaggi comparato con i modelli animali mammiferi.

In primis integra la superiorità delle immagini ottenute e della genetica degli zebrafish con l'estesa conoscenza della biologia del cancro umano e dei reagenti farmacologici sviluppati in decenni di ricerche. Infatti, il più riconosciuto vantaggio degli embrioni di zebrafish è dato dal fatto di essere trasparenti, il che, ad eccezione di alcuni studi di trapianto, non si applica alla maggior parte degli studi sul cancro condotti sugli animali adulti.

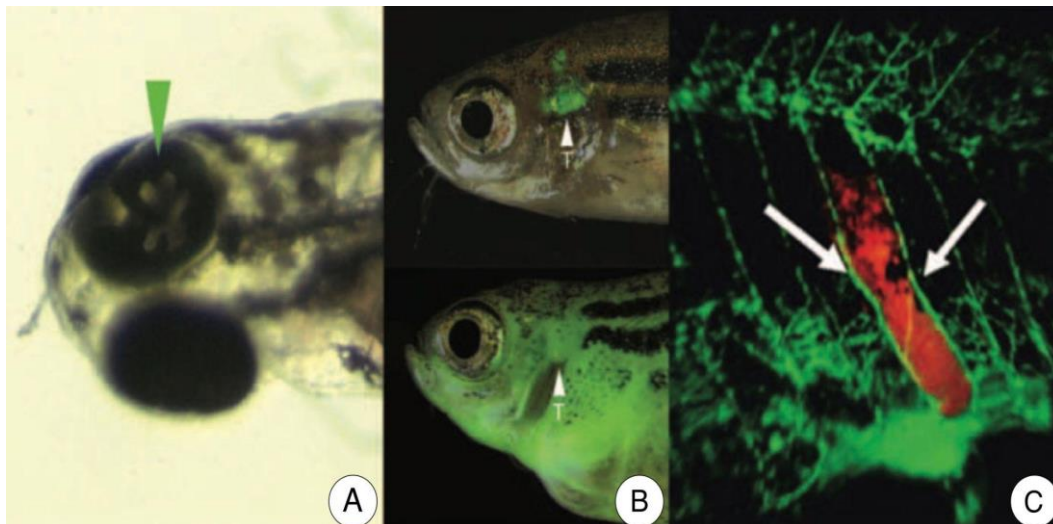
Il secondo vantaggio è che la proliferazione di cellule cancerogene negli zebrafish sono altamente suscettibili ai test farmacologici e questo, combinato con il loro basso costo, rende tale animale attraente per lo studio e lo sviluppo di nuove molecole terapeutiche.

Non per ultimo, gli zebrafish garantiscono un organismo vertebrato relativamente semplice dove poter decifrare i meccanismi farmacocinetici e farmacodinamici delle nuove molecole in vivo.

Goessling et al. [155] hanno applicato con successo la microscopia ad ultrasuoni ad alta risoluzione per seguire lo sviluppo dei tumori e la regressione degli stessi in seguito ai trattamenti in vivo in pesci adulti. Altre analisi di imaging esistenti che possono, in principio, essere utilizzate sono la tomografia e la risonanza magnetica [127]. Molto efficace e specifico per gli zebrafish si è dimostrato essere l'uso della fluorescenza. Benché gli zebrafish adulti siano di piccole dimensioni, si è comunque in grado di analizzare organi fluorescenti o tumori all'interno del corpo in vita. Infatti, gli studi di xenotrapianto hanno dimostrato che marcare le cellule di mammifero mediante fluorescenza rende più facile il monitoraggio del comportamento di tali cellule all'interno dell'ospite [142,145,156].

Le proprietà uniche degli zebrafish aprono le porte all'esplorazione dei meccanismi alla base della progressione tumorale nei vertebrati e fornisce i mezzi per lo sviluppo di promettenti agenti preclinici oltre che nella determinazione dei loro meccanismi d'azione.

Le cellule cancerose derivano da numerose specie e/o tessuti differenti che possono essere introdotti sia in embrioni giovani a 2-5 dpf sia in zebrafish più maturi a 30 dpf [129,142]. Entrambi i modelli di trapianto hanno i loro specifici vantaggi e limitazioni nella comprensione dei comportamenti delle cellule cancerose in vivo.



**Figura 9.** Le singolari caratteristiche dello zebrafish possono essere utilizzate al fine di studiare i diversi stadi di sviluppo del cancro. **(A)** L'instabilità genomica può portare ad un accumulo di mutazioni che possono risultare nello sviluppo del cancro. In questo caso la perdita di eterozigosità del gene albino si mostra come agglomerato di cellule (freccia) nello strato pigmentato dell'occhio di un embrione di zebrafish mutante in *msh6*. **(B)** La crescita del cancro può essere seguita nel tempo valutando uno zebrafish adulto. In questo caso viene mostrato lo sviluppo di una leucemia linfoblastica acuta in cui le cellule T vengono marcate tramite una proteina fluorescente verde all'interno di uno zebrafish transgenico stabile. Nell'immagine in alto troviamo il pesce *rag2-EGFP* di controllo, in basso invece il pesce *rag2-EGFP-mMyc* con una leucemia massiva; T, timo. **(C)** Invasione di cellule tumorali all'interno dei vasi sanguigni nella prima fase di sviluppo di metastasi. In questo caso le cellule umane cancerogene trapiantate e marcate con *dsRED* penetrano nei vasi sanguigni dello zebrafish marcati con una proteina fluorescente verde [157].

### 1.3.5 Direzioni future

L'utilizzo del modello zebrafish in campo oncologico è relativamente recente. Ciò nonostante, tale ricerca ha compiuto enormi progressi sviluppando strumenti versatili ed infrastrutture dedicate allo studio della progressione tumorale, validati con vari gradi. Risultano però necessari ulteriori studi per esplorare la similarità dei processi di carcinogenesi fra i modelli di zebrafish ed i mammiferi e la possibilità di traslare le informazioni ricavate dai primi verso le patologie umane. Dettagliati studi comparativi fra i modelli transgenici e di xenotrapianto di zebrafish e i corrispettivi modelli murini saranno fondamentali. Solo quando gli zebrafish avranno superato questo grado di sorveglianza potranno essere ampiamente accettati dalla comunità scientifica di ricerca sul cancro.

I risultati iniziali finora ottenuti sono sì incoraggianti ma saranno necessari studi addizionali per confermare che le cellule tumorali degli zebrafish e dell'uomo utilizzino le stesse modalità di diffusione vascolari e linfatiche e che i meccanismi guidanti tale processo siano i medesimi [130].

È stato verificato che le cellule tumorali secernono VEGF, che ha la capacità di indurre la generazione di nuovi vasi sanguigni negli zebrafish caratterizzati da una forma tortuosa, irregolare, con alterato spessore e permeabilità. Tutte queste caratteristiche sono state osservate nello sviluppo tumorale nei mammiferi.

Il modello zebrafish, sia esso embrionale o adulto, rappresenta un modello versatile utilizzabile nella ricerca di possibili trattamenti chimici. Alcune dimostrazioni derivano dall'uso degli inibitori dell'angiogenesi nel rimodellamento vascolare indotto dal trapianto. La neovascolarizzazione all'interno del trapianto tumorale può essere inibita dal trattamento mediante farmaci antiangiogenetici, mentre lo sviluppo della normale vascolarizzazione in questi embrioni sembra non essere influenzata [158].

Un altro tipo di ricerca per una possibile terapia riguarda gli agenti radioprotettivi, che sono di notevole rilevanza clinica considerando l'importanza della radioterapia nel trattamento del cancro. Come esempio, la nanoparticella DF-1 ha dimostrato di ridurre il danno da radiazioni ionizzanti in embrioni di zebrafish [159].

Una molecola di interesse si è dimostrata essere il 4-bromo-3-nitropropiofenone come sensibilizzatore di radiazioni specifico per le cellule cancerose. Negli zebrafish in cui è stato eseguito lo xenotrapianto di cellule tumorali umane e trattati con questo composto, la crescita tumorale è stata inibita dalle radiazioni mentre non vi è stato alcun effetto sul corretto sviluppo dell'embrione [160].

Riassumendo, lo zebrafish è una grande opportunità nella ricerca del cancro offrendo numerosi vantaggi non solo per studiare i meccanismi di formazione del cancro ma anche per la sua progressione [130].

### **1.3.6 Conclusioni**

Gli zebrafish possono essere un modello animale adatto per estendere la nostra conoscenza sui meccanismi molecolari e cellulari dei disordini cutanei e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

L'integrazione della genetica degli zebrafish con l'ampia gamma di reagenti disponibili per lo studio delle cellule tumorali umane fornisce un nuovo e promettente modello per visualizzare e analizzare i meccanismi che guidano la formazione del cancro, l'angiogenesi e la metastatizzazione [121].

Dato il loro basso costo di mantenimento, il genoma ben conservato e una più semplice manipolazione genetica, lo zebrafish è risultato essere un ottimo modello per la ricerca preclinica nei laboratori dermatologici, colmando il divario tra la coltura cellulare in vitro e i modelli mammiferi in vivo.



## II. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di realizzare il primo modello sperimentale in vivo di micosi fungoide, attraverso lo xenotrapianto di cellule di linfoma primitivo cutaneo umane in embrioni di zebrafish.

Lo studio è stato effettuato sfruttando la linea cellulare di micosi fungoide MyLa CD4+ trapiantata in embrioni di zebrafish al secondo giorno post fecondazione.

L'obiettivo primario è valutare l'applicabilità dello zebrafish come modello di studio per questa patologia, sondando a tal fine l'attecchimento e la reale proliferazione del tumore, rilevando conseguentemente la mortalità globale degli zebrafish come parametro surrogato.

L'obiettivo secondario è invece stato quello di determinare la variazione di mortalità partendo da un numero di cellule trapiantate differenti.



### III. MATERIALI E METODI

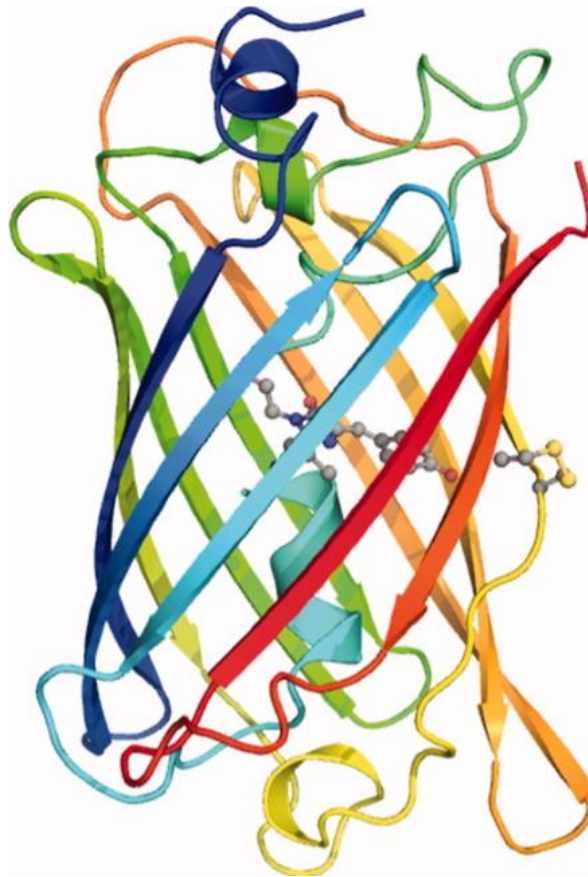
Per questo studio è stata utilizzata la linea cellulare di micosi fungoide denominata MyLa CD4+, acquistata dalla ditta Sigma-Aldrich (N° catalogo 95051032). Essa è costituita da cellule T originanti da una biopsia cutanea di un paziente caucasico 82enne affetto da micosi fungoide in stadio II, con inclusione di IL-2 ed IL-4 nel terreno di coltura. Le cellule di MyLa CD4+ esprimono CLA, CD2, CD3, CD4, CD25, CD71, HLA-DR, TCR  $\beta$ -18 e TCR-1  $\alpha/\beta$  [161].

Non vi è evidenza d'infezione delle linee cellulari da parte di HTLV-I ed il siero del paziente presenta sierologia negativa per HTLV-I e HTLV-II. Secondo i dati forniti dalla menzionata ditta, la linea cellulare ha dimostrato avere una bassa vitalità una volta estratta dalle basse temperature (ha infatti una temperatura di conservazione di  $-196^{\circ}\text{C}$ ) ed un lungo tempo di latenza prima di raggiungere la fase di crescita esponenziale. Il tempo di duplicazione della popolazione è di 20-24 ore [161].

Gli zebrafish utilizzati per questo studio sono appartenenti al ceppo mutante casper (alleli *mitfa w2 / mpv17 a9*, secondo il database ZFIN) che, come descritto nella parte introduttiva, ha la caratteristica di mantenere la trasparenza anche negli individui adulti.

#### 3.1 Trasfezione delle cellule di micosi fungoide

Per rendere le cellule tumorali evidenziabili e ben differenziabili da quelle dell'embrione di zebrafish, le cellule di micosi fungoide MyLa CD4+ sono state trasfettate mediante un plasmide esogeno contenente la GFP (Green Fluorescent Protein). Tale proteina, largamente utilizzata nella ricerca scientifica, ha la capacità di assorbire la luce blu per poi emetterla come luce fluorescente verde di minore energia. Questa caratteristica è fornita dalla peculiare struttura tridimensionale della proteina e dalla sequenza di soli tre amminoacidi treonina-tirosina-glicina, costituenti il cromoforo, posizionati al centro della stessa e totalmente schermati dall'ambiente circostante come visibile in Figura 10 [162].



**Figura 10.** La catena proteica della GFP è stata colorata ad arcobaleno, con colori che vanno dal blu (nella parte N-terminale) al rosso (nella parte C-terminale). La struttura della proteina ha una forma a barile generata da una disposizione ordinata di tratti a foglietto beta-piegheggiato. All'interno del barile entra un tratto di catena che contiene il cromoforo mostrato tramite rappresentazione in "ball and stick". Il cromoforo è al centro del barile, totalmente schermato dall'ambiente circostante. Questa schermatura è essenziale per la fluorescenza. Le molecole d'acqua, affollandosi attorno al cromoforo, assorbirebbero l'energia dopo che questo ha assorbito un fotone. All'interno della proteina, il cromoforo è protetto, e può rilasciare energia emettendo un fotone di luce con energia leggermente inferiore a quella assorbita [162].

Il plasmide a DNA pMax-GFP, realizzato appositamente per l'espressione eucariotica, è stato acquistato dalla compagnia biotecnologica Amaxa, facente parte del marchio Lonza Group AG [163].

La tecnica utilizzata per la trasfezione del plasmide è stata l'elettroporazione. Tale metodica prevede il posizionamento delle cellule di interesse, in questo caso quelle di micosi fungoide, ed il plasmide in una sospensione liquida all'interno di una cuvetta per poi applicare, tramite degli elettrodi, una scarica elettrica che

aumenta la permeabilità della membrana plasmatica facilitando l'entrata del plasmide prima a livello citoplasmatico e poi a livello nucleare, dove verrà in seguito trascritto.

Le cellule, una volta trasfettate, sono state poste in un terreno di cultura e in un secondo momento analizzate per osservare l'espressione della GFP mediante tecniche di microscopia e di citofluorimetria.

### **3.2 Xenotrapianto**

Gli embrioni di zebrafish sono stati ottenuti dall'accoppiamento di adulti di ceppo *casper*. Nello specifico, al giorno 0 (giorno dell'accoppiamento) le uova embrionali sono state raccolte ed incubate a 28 C in Fish Water (Embryo Medium: 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.1% Methylene blue in acqua distillata). Al giorno 2 post-fecondazione (2 dpf) gli embrioni sono stati privati del corion tramite rimozione meccanica, utilizzando aghi da insulina. Per eseguire il trapianto, gli embrioni a 2 dpf sono stati anestetizzati con Tricaina (MS222; E10521, Sigma–Aldrich, Milano, Italy), utilizzata alla concentrazione finale di 0.16 mg/mL in Fish Water. Gli embrioni anestetizzati sono stati allineati lungo un supporto di plastica a multi-corsie, immersi in un mezzo costituito da metil-cellulosa al 2% in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Le cellule, preparate alla densità finale di 0.2 x 10<sup>6</sup> cellule/uL, sono state caricate in un ago capillare vitreo, collegato poi ad un microiniettore a pressione (apparato WPI PicoPump). Tramite micro-iniezione, le cellule sono state depositate al centro del tuorlo di ogni embrione (circa 100-200 cellule per embrione). Infine, gli embrioni sono stati raccolti, rianimati ed incubati in nuova Fish Water, mantenendoli a 33°C, una temperatura di compromesso tra i 28°C dello zebrafish ed i 37°C delle cellule umane.

### **3.3 Suddivisione nei diversi gruppi e lotti**

Ai fini dello studio, gli zebrafish a due giorni post-fertilizzazione (*day post fertilisation*, dpf) sono stati divisi in due gruppi e ne è stata valutata la mortalità per i quattro giorni consecutivi. Il gruppo di controllo, ovverosia quello in cui non è stato effettuato alcun trapianto, è composto da quattro lotti, per un totale di 85 embrioni; il gruppo trapiantato è composto anch'esso da quattro lotti, per un totale di 61 embrioni.

Inoltre, dei 4 lotti trapiantati, tre di questi (per un totale di 48 embrioni) sono stati trapiantati con 100-200 cellule di micosi fungoide, mentre il quarto lotto (per un totale di 13 embrioni) è stato trapiantato con <10 cellule.

### **3.4 Acquisizione delle immagini**

Una volta effettuato il trapianto cellulare, per verificare la bontà dei precedenti processi svolti, gli embrioni sono stati analizzati tramite microscopia in fluorescenza sfruttando contemporaneamente sia la trasparenza caratteristica degli embrioni di zebrafish, sia la fluorescenza delle cellule tumorali impiantate. Per l'acquisizione delle immagini, le larve sono state anestetizzate con Tricaina e fotografate con un microscopio da dissezione Leica M165FC, equipaggiato con una camera CCD Leica DFC7000T controllata da software Leica Application Suite (LAS V4.8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). I pannelli delle immagini sono stati assemblati con Adobe Photoshop 21.1.1.

### **3.5 Quantificazione dei segnali**

I segnali acquisiti sono stati quantificati tramite l'opzione "Measurements" del software Volocity 6.0 (Perkin Elmer, Milano, Italy). L'analisi statistica a coppie tra gruppi di misurazioni è stata svolta tramite Unpaired t-test, mentre le comparazioni tra gruppi multipli di misurazioni è stata effettuata con ANOVA ad una via, seguita da test Tukey (software Graph Pad Prism V7.0).

### **3.6 Analisi istologiche**

Gli zebrafish trapiantati sopravvissuti al 6 dpf sono stati fissati in paraformaldeide (PFA) al 4% in tampone fosfato salino (PBS, Phosphate Buffered Saline) a 4°C per la preservazione dei tessuti e le successive indagini istologiche.

### **3.7 Analisi statistiche**

Per quanto riguarda la formulazione di tabelle e grafici contenuti nella tesi è stato utilizzato il programma Excel. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test Chi-quadrato ed i risultati che hanno prodotto valori inferiori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

### **3.8 Approvazione etica**

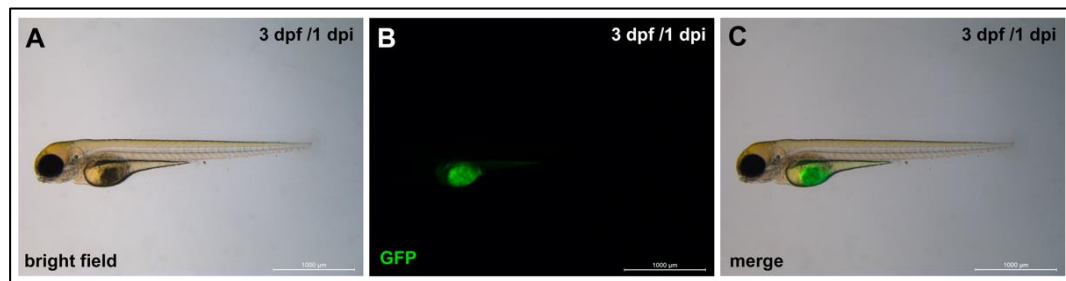
Gli esperimenti con zebrafish sono stati svolti in accordo con la legislazione italiana ed europea (Direttiva 2010/63/EU) e col permesso alla sperimentazione animale rilasciato dal Comitato Etico dell'Università di Padova (OPBA) e dal Ministero Italiano della Salute (Autorizzazione n. 407/2015-PR).





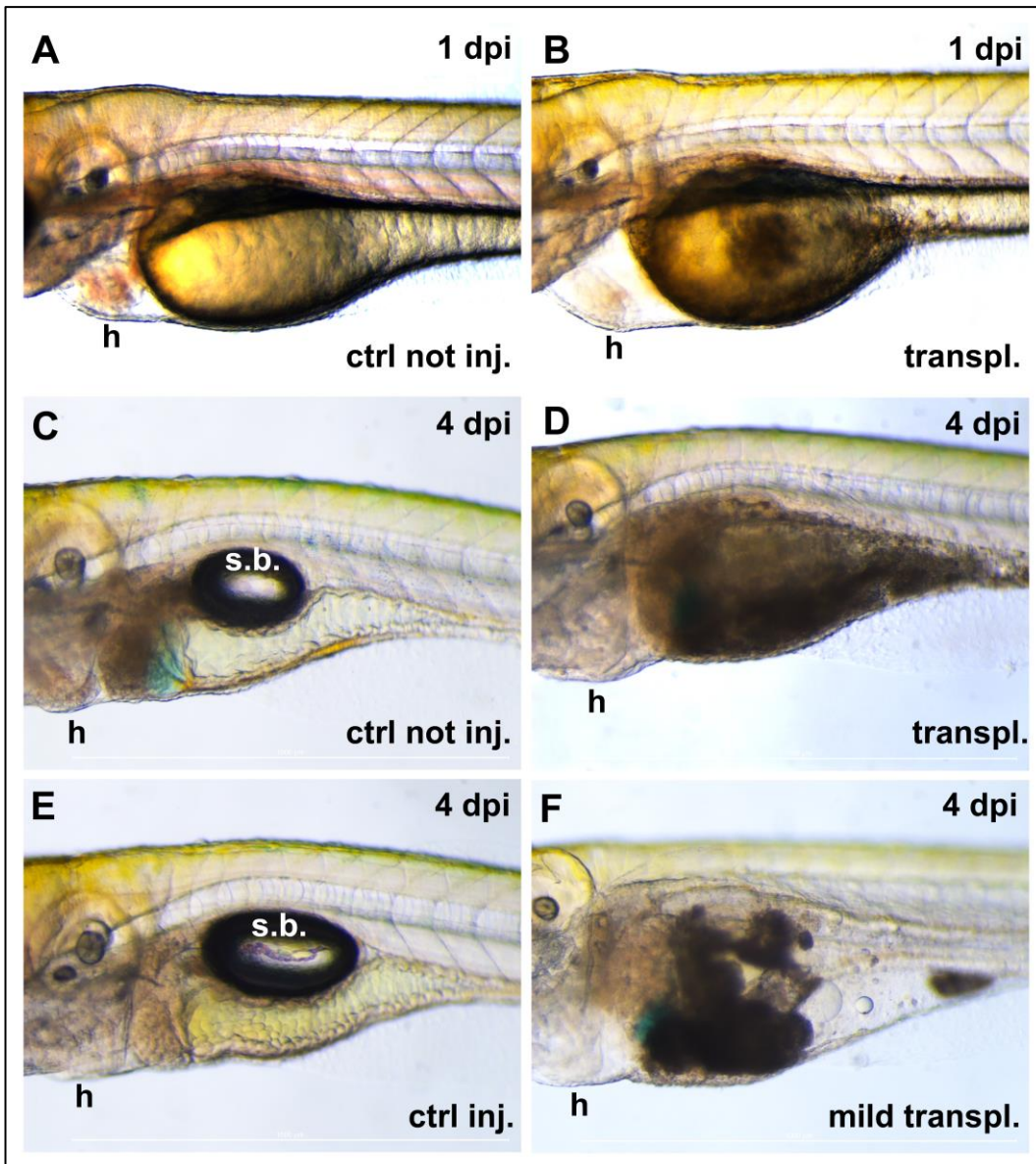
## IV. RISULTATI

In via preliminare, per mettere a punto la tecnica di trapianto, la preparazione delle cellule trasfettate con GFP e la loro visualizzazione *in vivo*, un piccolo lotto di zebrafish embrionali è stato trapiantato a 2 giorni post-fecondazione (2 dpf) e visualizzato 24 ore dopo, a 3 dpf /1 dpi (1 day post injection), utilizzando un microscopio da dissezione, equipaggiato con fotocamera. Un esempio di embrione trapiantato è visualizzato in Figura 11, ove è possibile apprezzare la massa cellulare trapiantata nella regione del tuorlo, sia in luce visibile, sia in luce fluorescente.



**Figura 11.** Esempio di embrione di zebrafish a 3 dpf/1 dpi, ospitante una massa cellulare trapiantata nella regione del tuorlo. La massa cellulare è osservabile *in vivo* sia in campo chiaro (A, bright field), sia in luce fluorescente verde (B, GFP) sia in sovrapposizione di segnali (C, merge); la fluorescenza verde è emessa dalla GFP prodotta dalle cellule trasfettate. Tutte le immagini sono in vista laterale, anteriore a sinistra.

I 146 zebrafish utilizzati nello studio sono stati prima di tutto divisi in due gruppi, uno di controllo e uno di soggetti a xenotrapianto. Esempi di controlli e xenotrapiantati, osservati a 1 dpi (3 dpf) e a 4 dpi (6 dpf), sono illustrati in Figura 12.



**Figura 12.** Xenotrapianto di cellule di micosi fungoide in zebrafish e monitoraggio nel tempo. **(A)** Embrione di controllo allo stadio di 3 dpf, non trapiantato, osservato a 1 dpi (day post injection). **(B)** Embrione trapiantato, analizzato a 1 dpi. Si noti la massa cellulare depositata nel centro del tuorlo. **(C)** Larva di controllo, non iniettata, osservata a 4 dpi (6 dpf). Si noti la presenza della vescica natatoria (s.b.: swim bladder). **(D)** Larva trapiantata: si noti l'invasione dell'intera area del tuorlo da parte delle cellule trapiantate. La vescica natatoria è assente. **(E)** Larva di controllo iniettata con soluzione di controllo (medium cellulare); l'aspetto è indistinguibile da una larva non iniettata. **(F)** Larva iniettata con poche cellule. Nonostante il limitato numero di cellule di partenza, vi è un'apprezzabile invasione dell'area del tuorlo. La vescica natatoria è assente. In tutte le immagini il cuore è indicato da h (heart). Si noti la tendenza all'edema pericardico negli zebrafish trapiantati. Tutte le immagini sono in vista laterale, anteriore a sinistra.

Successivamente, nei seguenti gruppi è stata eseguita un'ulteriore ripartizione in 4 lotti. I risultati così ottenuti sono stati riportati nelle tabelle XI e XII.

<b><u>Lotti non trapiantati</u></b>	<b>2 dpf</b>	<b>3 dpf</b>	<b>4dpf</b>	<b>5 dpf</b>	<b>6dpf</b>
<b>Lotto 1</b>	23	23	23	23	22
Mortalità	/	0% (0/23)	0% (0/23)	0% (0/23)	4,3% (1/23)
<b>Lotto 2</b>	21	21	21	21	21
Mortalità	/	0% (0/21)	0% (0/21)	0% (0/21)	0% (0/21)
<b>Lotto 3</b>	21	21	21	19	19
Mortalità	/	0% (0/21)	0% (0/21)	9,5% (2/21)	9,5% (2/21)
<b>Lotto 4</b>	20	20	20	19	19
Mortalità	/	0% (0/20)	0% (0/20)	5% (1/20)	5% (1/20)
<b>Mortalità globale</b>	/	0% (0/85)	0% (0/85)	3,5% (3/85)	4,7% (4/85)

*Tabella XI. Numerosità e mortalità del gruppo di controllo costituito dagli zebrafish non trapiantati. Dpf – day post fertilisation.*

Per quanto riguarda il gruppo di controllo non trapiantato, costituito da 85 zebrafish, i decessi riscontrati nei 4 giorni successivi all'inizio del monitoraggio sono stati di 4 embrioni, con una mortalità calcolata del 4,7%. Inoltre, in tutti i lotti la mortalità è paragonabile e ciò dimostra che in tutti i lotti sono state mantenute e garantite le medesime condizioni ambientali.

Dalle valutazioni macroscopiche effettuate su tale gruppo, facilitate dall'utilizzo del ceppo mutante casper come modello di studio, è stato riscontrato un normale sviluppo degli embrioni associato ad un corretto rigonfiamento della vescica natatoria, fondamentale per il controllo del galleggiamento.

<b><u>Lotti trapiantati</u></b>	<b>2 dpf</b>	<b>3 dpf / 1 dpt</b>	<b>4dpf / 2 dpt</b>	<b>5 dpf / 3 dpt</b>	<b>6dpf / 4 dpt</b>
<b>Lotto 1</b> (100-200 cellule)	17	17	6	1	0
Mortalità	/	0% (0/17)	64,7% (11/17)	94,1% (16/17)	100% (17/17)
<b>Lotto 2</b> (100-200 cellule)	15	15	5	2	0
Mortalità	/	0% (0/15)	66,6% (10/15)	86,6% (13/15)	100% (15/15)
<b>Lotto 3</b> (100-200 cellule)	16	16	11	7	4
Mortalità	/	0% (0/16)	31,2% (5/16)	56,2% (9/16)	75% (12/16)
<b>Mortalità globale lotti 1-2-3</b>	/	0% (0/48)	54,1% (26/48)	79,2% (38/48)	91,7% (44/48)
<b>Lotto 4</b> (<10 cellule)	13	13	13	11	8
Mortalità	/	0% (0/13)	0% (0/13)	15,4% (2/13)	38,5% (5/13)

*Tabella XII. Numerosità e mortalità del gruppo di zebrafish sottoposto a xenotrapianto. Da notare come nei lotti 1-2-3 siano state iniettate dalle 100-200 cellule, mentre nel lotto 4 solamente <10. Dpf – day post fertilisation; dpt – day post transplantation.*

Il gruppo di zebrafish sottoposto a xenotrapianto è invece costituito da 61 embrioni, di cui 48 (appartenenti ai lotti 1-2-3) sottoposti ad iniezione di 100-200 cellule tumorali, mentre i 13 embrioni appartenenti al lotto 4 sono stati invece trapiantati con <10 cellule tumorali.

I risultati ottenuti da questo lavoro sono risultati eclatanti: i primi tre lotti dopo soli 4 giorni di osservazione hanno portato ad un numero di decessi pari a 44, con una mortalità calcolata del 91,7%.

Come visibile in Tabella XIII sottostante, la mortalità tra questi tre lotti ed il gruppo non trapiantato valutato mediante il test Chi-quadrato ha dimostrato una differenza statisticamente significativa, con un valore di  $p < 0,0001$ .

	<b>Non trapiantati</b>	<b>Trapiantati (lotti 1-2-3)</b>	<b>Totale</b>
<b>Decessi</b>	4	44	48
<b>In vita</b>	81	4	85
<b>Totale</b>	85	48	133

<b>Statistica</b>	<b>Gradi di libertà</b>	<b>Valore</b>	<b>P</b>
Chi-quadrato	1	100.5777	<0.0001

**Tabella XIII.** Valutazione della significatività statistica fra il gruppo di controllo non trapiantato ed il gruppo trapiantato con 100-200 cellule (lotti 1-2-3) attraverso il test Chi-quadrato.

Interessante è invece notare il dato di mortalità relativo al lotto 4, in cui i decessi nei 4 giorni di osservazione successivi all'iniezione delle cellule sono stati 5, con una mortalità calcolata del 38,5%. Anche in questo caso è stata valutata la significatività statistica fra la mortalità riscontrata nel lotto 4 ed il gruppo di controllo non trapiantato come visibile in Tabella XIV e anche qui la differenza è considerata statisticamente significativa con  $p < 0,0001$ .

	Non trapiantati	Trapiantati (lotto 4)	Totale
<b>Decessi</b>	4	5	9
<b>In vita</b>	81	8	89
<b>Totale</b>	85	13	98

	Statistica	Gradi di libertà	Valore	P
	Chi-quadrato	1	15.4045	<0.0001

**Tabella XIV.** Valutazione della significatività statistica fra il gruppo di controllo non trapiantato ed il lotto 4 trapiantato con <10 cellule attraverso il test Chi-quadrato.

Negli 8 zebrafish di tale lotto rimasti in vita a 6 dpf, sono state eseguite ulteriori analisi istologiche ed è stata evidenziata la presenza di grandi masse tumorali nel 50% dei essi e di cellule tumorali identificabili nell'87,5% degli embrioni che però chiaramente non sono state in grado di portare alla morte dello zebrafish in questo lasso di tempo.

Per quanto riguarda l'intero gruppo di embrioni trapiantati è stato rilevato un edema generalizzato nella stragrande maggioranza degli zebrafish, maggiormente concentrato però a livello cardiaco. Inoltre, lo sviluppo embrionale, rispetto al gruppo di controllo, si è dimostrato sin da subito ritardato ed associato ad una rallentata inflazione della vescica natatoria.

Interessante risulta essere il confronto fra il lotto 4 ed i primi tre: si può infatti notare come la mortalità a 4 dpf non sia, tra i due gruppi, paragonabile, ma rapportando la mortalità del lotto 4 con quella del gruppo di controllo si ottiene nuovamente una differenza statisticamente significativa.

I dati istologici riguardanti gli embrioni ancora in vita al 6 dpf hanno però dimostrato che le cellule tumorali erano presenti nella quasi totalità degli zebrafish (7/8, 87,5%) e che nel 50% dei casi si erano sviluppate grosse masse tumorali. Pertanto, si ritiene con buona probabilità che, prolungando il periodo di osservazione di qualche giorno, si sarebbero ottenuti gli stessi valori di mortalità riscontrati per i lotti 1-2-3.

Questi risultati dimostrano che, anche con il trapianto di un numero inferiore di cellule, lo xenotrapianto funziona ed il modello di zebrafish si dimostra una valida alternativa agli altri modelli animali già a nostra disposizione.

Un'ulteriore deduzione derivabile dall'analisi sul lotto 4 è quella relativa al grado di attecchimento e di proliferazione cellulare all'interno del microambiente embrionale. Tenendo conto del tempo di duplicazione cellulare di 20-24h fornitoci direttamente dalla ditta Sigma-Aldrich in fase di acquisto, il lotto 4 avrebbe dovuto raggiungere le 100 cellule (cellule minime dei lotti 1-2-3) al 5 dpf. Partendo da questo dato e considerato il comportamento e la mortalità dei primi tre lotti trapiantati, la discesa nella curva di sopravvivenza (Figura 12) sarebbe dovuta avvenire di conseguenza tra il 6 dpf ed il 7 dpf, mentre il calo della sopravvivenza (e l'inizio dei decessi) si è osservato già a partire dal 5 dpf.

Tali risultati sono spiegabili tramite due ipotesi: la prima vede le cellule tumorali impiantate portare ad una alterazione dei processi maturativi fisiologici dello zebrafish che possono esitare nel decesso dell'individuo; una seconda ipotesi potrebbe invece essere quella per cui le cellule tumorali acquisiscano, in quel determinato microambiente, un aumentato tasso proliferativo rispetto al previsto, inducendo a ritenere che l'ambiente embrionale teleosteo risulti particolarmente adatto alla proliferazione delle cellule tumorali in vivo.

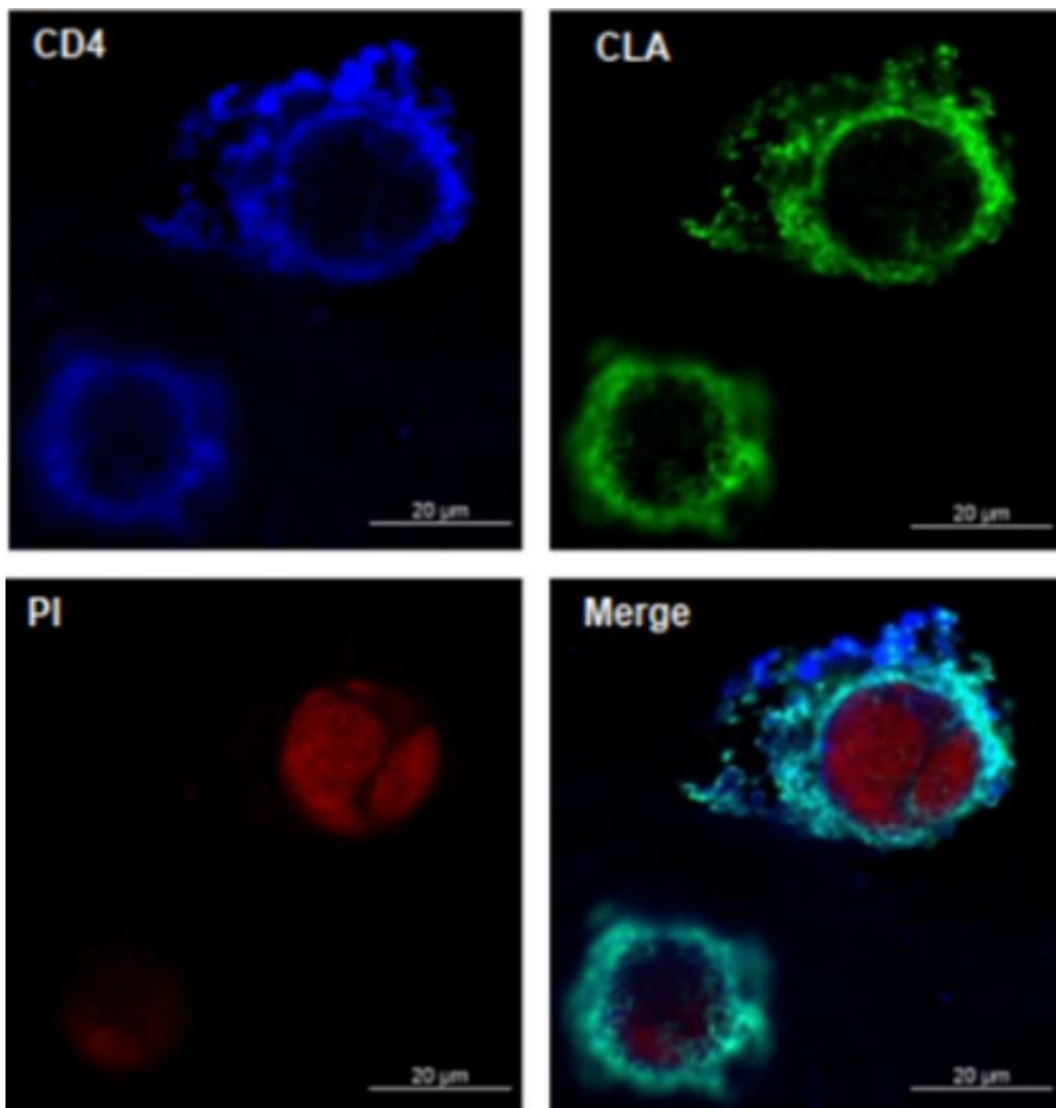
## V. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La micosi fungoide (MF) è la forma di linfoma primitivo cutaneo a cellule T più frequente, caratterizzata da un decorso clinico indolente e dalla progressione attraverso i tre diversi stadi di chiazza, placca e nodulo tumorale.

Attualmente le terapie adottate si basano sullo stadio raggiunto dalla patologia e dall'età del paziente alla diagnosi. Il trattamento degli stadi iniziali avviene mediante terapie topiche, con buoni risultati, anche se comunque il 30% dei pazienti progredisce verso stadi avanzati di malattia. La cura degli stadi avanzati prevede terapie sistemiche o combinate con prognosi ad oggi infausta.

Recentemente, in alternativa alla terapia convenzionale, sono stati proposti anche vari approcci immunoterapici. Alcuni degli anticorpi monoclonali proposti sono l'Alemtuzumab, il Brentuximab Vedotin ed il Mogalizumab, che presentano come bersaglio antigeni comuni, e di conseguenza non specifici, a tutti i linfociti T, generando però un gran numero di effetti collaterali, talvolta anche gravi per la salute dei pazienti.

Nel recente passato il laboratorio di immunologia e diagnostica molecolare oncologica dell'Istituto Oncologico Veneto (IOV) e il laboratorio della Clinica Dermatologica di Padova hanno svolto due principali studi sulla micosi fungoide. Il primo valutava l'eventuale espressione del CLA da parte delle cellule di MF ed il suo utilizzo come potenziale bersaglio molecolare per una futura target therapy. Tali studi hanno dimostrato tramite la microscopia confocale che circa il 90% delle cellule MyLa CD4+ esprime effettivamente l'antigene CLA e che questo presenta una distribuzione prevalente a livello della membrana plasmatica come visibile in Figura 11.



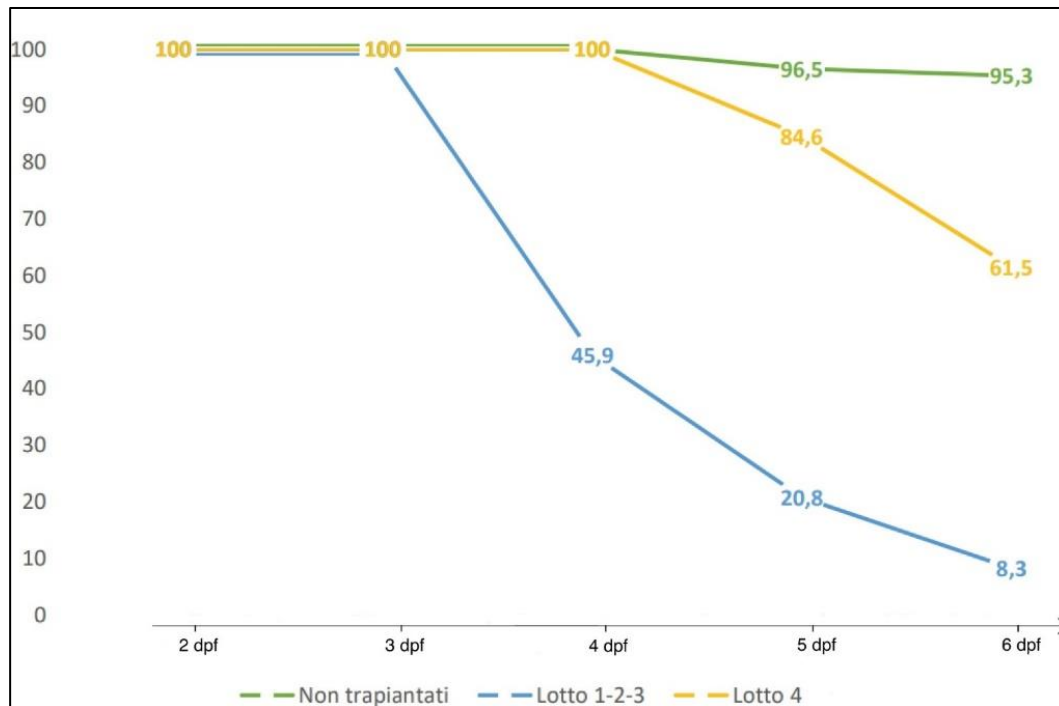
**Figura 11.** Cellule My-La CD4<sup>+</sup> colorate con anticorpi anti-CD4 (in blu), anti-CLA (in verde) e propidio ioduro per l'identificazione dei nuclei (rosso). Nell'immagine in basso a destra le tre diverse fotografie sono state fuse insieme. Le immagini sono state ottenute attraverso un microscopio confocale.

Visti tali dati, si è ipotizzato di utilizzare il CLA come potenziale bersaglio molecolare per un'innovativa terapia ad approccio fotoimmunoterapico, che prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-CLA coniugato ad una molecola attivata dall'irradiazione nell'infrarosso [164]. Il laboratorio della Clinica Dermatologica di Padova ha coniugato con successo l'anticorpo anti-CLA puro alla molecola fotoinducibile IRDye® 700DX. Tale tecnica ha prodotto risultati incoraggianti in vitro, dimostrando una scarsa tossicità ed un'elevata selettività. In particolare, si è visto che sia i raggi infrarossi sia il composto fotoattivo, non comportano alcun rischio per la salute [165].



Il lavoro presentato in questa tesi è intimamente connesso ai lavori precedentemente svolti e sopradescritti, in quanto atto a dimostrare la possibilità di utilizzare lo zebrafish come modello di studio in vivo per la micosi fungoide.

I dati di mortalità ottenuti mediante questo lavoro, quali marcatore surrogato per valutare l'attecchimento e la proliferazione delle cellule tumorali, sono molto incoraggianti e sono riassunti nella Figura 12 sottostante (utilizzando il parametro sopravvivenza dei vari lotti calcolato a partire dalla mortalità).



**Figura 12.** Sopravvivenza degli zebrafish dopo xenotrapianto. Il grafico pone la sopravvivenza in percentuale sull'asse delle ordinate ed il tempo di studio sull'asse delle ascisse. I lotti trapiantati sono stati differenziati in base al numero di cellule iniettate all'interno degli embrioni.

Come si evince dal grafico (Figura 12) e dalle tabelle mostrate nel capitolo "Risultati", lo xenotrapianto cellulare in embrioni di zebrafish funziona e, a giudicare dalla letalità e dalla crescita della massa tumorale, si è dimostrato molto aggressivo nei confronti dell'organismo ospite. Le cellule tumorali trapiantate, infatti, hanno presentato un ottimale adattamento ai tessuti teleostei ed una proliferazione particolarmente rapida, portando rapidamente alla morte dell'organismo ospite.

Inoltre, lo studio dell'ultimo dei lotti trapiantati (lotto 4) ha dimostrato come anche con l'utilizzo di un numero inferiore di cellule iniettate (<10 cellule) lo xenotrapianto dia risultati positivi quanto a proliferazione cellulare. All'analisi istologica successiva degli embrioni trapiantati sopravvissuti al 6 dpf sono state riscontrate grosse masse tumorali nel 50% dei casi oltre al riscontro di cellule

tumorali nell'87,5% degli embrioni, nonostante queste non siano state in grado di portare alla morte degli zebrafish in quantità paragonabili all'iniezione di 100-200 cellule tumorali (lotti 1-2-3).

In ragione di ciò, ulteriori studi dovranno essere effettuati per poter determinare quale sia il miglior numero di cellule da iniettare negli zebrafish per poter valutare al meglio la risposta a futuri trattamenti patologia-specifici.

In un mondo in cui la cosiddetta “terapia di precisione” risulta sempre più importante, la disponibilità di modelli animali efficaci ed economici permette di vagliare la miglior risposta terapeutica non solo per la singola patologia ma anche per il singolo paziente. Ciò permetterà di aprire nuove strade per l'utilizzo di tale metodica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kempf W, Mitteldorf C. Cutaneous T-cell lymphomas-An update 2021. *Hematol Oncol*. 2021;39 Suppl 1:46–51.
2. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 18 aprile 2019;133(16):1703–14.
3. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJLM. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 15 maggio 2005;105(10):3768–85.
4. Van Doorn R, Scheffer E, Willemze R. Follicular mycosis fungoides, a distinct disease entity with or without associated follicular mucinosis: a clinicopathologic and follow-up study of 51 patients. *Arch Dermatol*. febbraio 2002;138(2):191–8.
5. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wain EM, Wilkins B, Fields PA, Dean A, Webb K, Scarisbrick J, Morris S, Whittaker SJ. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1° novembre 2010;28(31):4730–9.
6. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet Lond Engl*. 15 marzo 2008;371(9616):945–57.
7. Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 15 giugno 2000;95(12):3653–61.
8. Kempf W, Pfaltz K, Vermeer MH, Cozzio A, Ortiz-Romero PL, Bagot M, Olsen E, Kim YH, Dummer R, Pimpinelli N, Whittaker S, Hodak E, Cerroni L, Berti E, Horwitz S, Prince HM, Guitart J, Estrach T, Sanches JA, Duvic M, Ranki A, Dreno B, Ostheeren-Michaelis S, Knobler R, Wood G, Willemze R. EORTC, ISCL, and USCLC consensus recommendations for the treatment of primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders: lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 13 ottobre 2011;118(15):4024–35.
9. Cerroni L. Past, present and future of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol*. gennaio 2017;34(1):3–14.

10. Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, Specht L, Ladetto M, ESMO Guidelines Committee. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 ottobre 2018;29(Suppl 4):iv30–40.
11. Park JH, Shin HT, Lee DY, Lee JH, Yang JM, Jang KT, Ko YH. World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification of cutaneous lymphoma in Korea: a retrospective study at a single tertiary institution. *J Am Acad Dermatol*. dicembre 2012;67(6):1200–9.
12. Tan SH, Sim CS, Ong BH. Cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides in Singapore: a clinicopathological analysis using recent classification systems. *Br J Dermatol*. settembre 2003;149(3):542–53.
13. Vermeer M. Epidemiology of cutaneous lymphoma. *Br J Dermatol*. giugno 2021;184(6):993–4.
14. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*. 143(7):854–9.
15. Markova A, Weinstock MA. Trends in cutaneous lymphoma epidemiology. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. settembre 2010;10 Suppl 2:S63-66.
16. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*. 21 maggio 2009;113(21):5064–73.
17. Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol*. luglio 2001;137(7):949–52.
18. Stadler R, Stranzenbach R. Molecular pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Exp Dermatol*. ottobre 2018;27(10):1078–83.
19. Miyagaki T. Diagnosis and prognostic stratification of cutaneous lymphoma. *J Dermatol*. febbraio 2022;49(2):210–22.
20. Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol*. luglio 2003;139(7):857–66.
21. Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol*. luglio 2007;143(7):921–32.
22. Holm N, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA. The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol*. settembre 2002;29(8):447–52.

23. Specht L, Skov L. Cutaneous Lymphomas. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. novembre 2019;31(11):797–807.
24. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müeller SP, Schwartz LH, Zucca E, Fisher RI, Trotman J, Hoekstra OS, Hicks RJ, O'Doherty MJ, Hustinx R, Biggi A, Cheson BD. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 settembre 2014;32(27):3048–58.
25. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S, ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 15 settembre 2007;110(6):1713–22.
26. Stadler R, Otte HG, Luger T, Henz BM, Köhl P, Zwingers T, Sterry W. Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. *Blood*. 15 novembre 1998;92(10):3578–81.
27. Straus DJ, Duvic M, Kuzel T, Horwitz S, Demierre MF, Myskowski P, Steckel S. Results of a phase II trial of oral bexarotene (Targretin) combined with interferon alfa-2b (Intron-A) for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer*. 1 maggio 2007;109(9):1799–803.
28. Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol*. marzo 1999;40(3):418–25.
29. Yu JB, Blitzblau RC, Decker RH, Housman DM, Wilson LD. Analysis of primary CD30+ cutaneous lymphoproliferative disease and survival from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 marzo 2008;26(9):1483–8.
30. Pimpinelli N, Santucci M, Bosi A, Moretti S, Vallecchi C, Messori A, Giannotti B. Primary cutaneous follicular centre-cell lymphoma--a lymphoproliferative disease with favourable prognosis. *Clin Exp Dermatol*. gennaio 1989;14(1):12–9.
31. Bouaziz JD, Bastuji-Garin S, Poszepczynska-Guigné E, Wechsler J, Bagot M. Relative frequency and survival of patients with primary cutaneous lymphomas: data from a single-centre study of 203 patients. *Br J Dermatol*. giugno 2006;154(6):1206–7.
32. Cutaneous T cell lymphoma. *Nat Rev Dis Primer*. 26 agosto 2021;7(62).
33. Alibert JL. Monographie des dermatoses, ou précis théorique et pratique des maladies de la peau. Chez le Docteur Daynac, éditeur; 1832. 872 pag.

34. Mahalingam M, Reddy VB. Mycosis Fungoides, Then and Now... Have We Travelled? *Adv Anat Pathol.* novembre 2015;22(6):376–83.
35. Cerroni L. Mycosis fungoides-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* marzo 2018;37(1):2–10.
36. Fink-Puches R, Chott A, Ardigó M, Simonitsch I, Ferrara G, Kerl H, Cerroni L. The spectrum of cutaneous lymphomas in patients less than 20 years of age. *Pediatr Dermatol.* ottobre 2004;21(5):525–33.
37. Chang Su, Kevin A Nguyen, Harrison X Bai, Ya Cao, Yongguang Tao, Rong Xiao. Racial disparity in mycosis fungoides: An analysis of 4495 cases from the US National Cancer Database. 2017;77(3):497-502.e2.
38. Tan RS, Butterworth CM, McLaughlin H, Malka S, Samman PD. Mycosis fungoides--a disease of antigen persistence. *Br J Dermatol.* dicembre 1974;91(6):607–16.
39. Beyer M, Möbs M, Humme D, Sterry W. Pathogenesis of Mycosis fungoides. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG.* agosto 2011;9(8):594–8.
40. Magro CM, Dysrsen ME. Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T-cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol.* novembre 2008;35(11):1040–9.
41. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 5 agosto 2010;116(5):767–71.
42. Kallinich T, Mucche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* novembre 2003;121(5):1045–52.
43. Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting T. Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol.* febbraio 2005;152(2):258–64.
44. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 19 dicembre 2008;29(6):848–62.
45. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S, Ødum N. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia.* luglio 2004;18(7):1288–95.

46. Goteri G, Filosa A, Mannello B, Stramazotti D, Rupoli S, Leoni P, Fabris G. Density of neoplastic lymphoid infiltrate, CD8<sup>+</sup> T cells, and CD1a<sup>+</sup> dendritic cells in mycosis fungoides. *J Clin Pathol.* giugno 2003;56(6):453–8.
47. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* marzo 1995;32(3):448–53.
48. Berger CL, Xu AL, Hanlon D, Lee C, Schechner J, Glusac E, Christensen I, Snyder E, Holloway V, Tigelaar R, Edelson RL. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int J Cancer.* 15 febbraio 2001;91(4):438–47.
49. Zoi-Toli O, Vermeer MH, De Vries E, Van Beek P, Meijer CJ, Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br J Dermatol.* agosto 2000;143(2):313–9.
50. Ni X, Hazarika P, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape? *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* settembre 2001;7(9):2682–92.
51. Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol.* dicembre 2000;143(6):1205–10.
52. Querfeld C, Zain J, Rosen ST. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas: Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Cancer Treat Res.* 2019;176:225–48.
53. Van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, Knijnenburg J, Boer JM, Willemze R, Tensen CP. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sézary syndrome. *Blood.* 1 gennaio 2009;113(1):127–36.
54. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 15 ottobre 1999;13(20):2658–69.
55. Kamstrup MR, Gjerdrum LMR, Biskup E, Lauenborg BT, Ralfkiaer E, Woetmann A, Ødum N, Gniadecki R. Notch1 as a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 7 ottobre 2010;116(14):2504–12.
56. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, Dorosario AA, Chaney KS, Cutler CS, Leboeuf NR, Carter JB, Fisher DC, Kupper TS. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med.* 18 gennaio 2012;4(117):117ra7.

57. Cerroni L, Rieger E, Hödl S, Kerl H. Clinicopathologic and immunologic features associated with transformation of mycosis fungoides to large-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* giugno 1992;16(6):543–52.
58. Epstein EH, Levin DL, Croft JD, Lutzner MA. Mycosis fungoides. Survival, prognostic features, response to therapy, and autopsy findings. *Medicine (Baltimore).* gennaio 1972;51(1):61–72.
59. Muñoz-González H, Molina-Ruiz AM, Requena L. Clinicopathologic Variants of Mycosis Fungoides. *Actas Dermosifiliogr.* aprile 2017;108(3):192–208.
60. Hodak E, Amitay-Laish I. Mycosis fungoides: A great imitator. *Clin Dermatol.* giugno 2019;37(3):255–67.
61. Gerami P, Rosen S, Kuzel T, Boone SL, Guitart J. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* giugno 2008;144(6):738–46.
62. Lehman JS, Cook-Norris RH, Weed BR, Weenig RH, Gibson LE, Weaver AL, Pittelkow MR. Folliculotropic mycosis fungoides: single-center study and systematic review. *Arch Dermatol.* giugno 2010;146(6):607–13.
63. Wieser I, Wang C, Alberti-Violetti S, Lyons G, Tran C, Talpur R, Duvic M. Clinical characteristics, risk factors and long-term outcome of 114 patients with folliculotropic mycosis fungoides. *Arch Dermatol Res.* agosto 2017;309(6):453–9.
64. Hodak E, Amitay-Laish I, Feinmesser M, Davidovici B, David M, Zvulunov A, Pavlotsky F, Yaniv I, Avrahami G, Ben-Amitai D. Juvenile mycosis fungoides: cutaneous T-cell lymphoma with frequent follicular involvement. *J Am Acad Dermatol.* giugno 2014;70(6):993–1001.
65. Boulos S, Vaid R, Aladily TN, Ivan DS, Talpur R, Duvic M. Clinical presentation, immunopathology, and treatment of juvenile-onset mycosis fungoides: a case series of 34 patients. *J Am Acad Dermatol.* dicembre 2014;71(6):1117–26.
66. Hodak E, Amitay-Laish I, Atzmony L, Prag-Naveh H, Yanichkin N, Barzilai A, Kershenovich R, Feinmesser M. New insights into folliculotropic mycosis fungoides (FMF): A single-center experience. *J Am Acad Dermatol.* agosto 2016;75(2):347–55.
67. Gerami P, Guitart J. The spectrum of histopathologic and immunohistochemical findings in folliculotropic mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol.* settembre 2007;31(9):1430–8.
68. Van Santen S, Roach REJ, van Doorn R, Horváth B, Bruijn MS, Sanders CJG, de Pooter JC, van Rossum MM, de Haas ERM, Veraart JCJM, Bekkenk MW, Vermeer MH, Willemze R. Clinical Staging and Prognostic Factors in Folliculotropic Mycosis Fungoides. *JAMA Dermatol.* 1 settembre 2016;152(9):992–1000.



69. Haghghi B, Smoller BR, LeBoit PE, Warnke RA, Sander CA, Kohler S. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* maggio 2000;13(5):502–10.
70. Steffen C. Ketron-Goodman disease, Woringer-Kolopp disease, and pagetoid reticulosis. *Am J Dermatopathol.* febbraio 2005;27(1):68–85.
71. Kempf W, Ostheeren-Michaelis S, Paulli M, Lucioni M, Wechsler J, Audring H, Assaf C, Rüdiger T, Willemze R, Meijer CJLM, Berti E, Cerroni L, Santucci M, Hallermann C, Berneburg M, Chimenti S, Robson A, Marschalko M, Kazakov DV, Petrella T, Fraitag S, Carlotti A, Courville P, Laeng H, Knobler R, Golling P, Dummer R, Burg G, Cutaneous Lymphoma Histopathology Task Force Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Granulomatous mycosis fungoides and granulomatous slack skin: a multicenter study of the Cutaneous Lymphoma Histopathology Task Force Group of the European Organization For Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Arch Dermatol.* dicembre 2008;144(12):1609–17.
72. Van Haselen CW, Toonstra J, van der Putte SJ, van Dongen JJ, van Hees CL, van Vloten WA. Granulomatous slack skin. Report of three patients with an updated review of the literature. *Dermatol Basel Switz.* 1998;196(4):382–91.
73. Clarijs M, Poot F, Laka A, Pirard C, Bourlond A. Granulomatous slack skin: treatment with extensive surgery and review of the literature. *Dermatol Basel Switz.* 2003;206(4):393–7.
74. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* marzo 2018;37(1):11–7.
75. Amorim GM, Niemeyer-Corbellini JP, Quintella DC, Cuzzi T, Ramos-E-Silva M. Hypopigmented mycosis fungoides: a 20-case retrospective series. *Int J Dermatol.* marzo 2018;57(3):306–12.
76. Pavlovsky L, Mimouni D, Amitay-Laish I, Feinmesser M, David M, Hodak E. Hyperpigmented mycosis fungoides: an unusual variant of cutaneous T-cell lymphoma with a frequent CD8+ phenotype. *J Am Acad Dermatol.* luglio 2012;67(1):69–75.
77. Neill SM, Monk BE, du Vivier A. Mycosis fungoides associated with acanthosis nigricans. *J R Soc Med.* gennaio 1985;78(1):79–81.
78. Azizpour A, Ghanadan A, Nasimi M, Etesami I. Psoriasiform mycosis fungoides: a rare form of the disease with review of the literature. *Dermatol Online J.* 15 settembre 2017;23(9):13030/qt9mv8r0j7.
79. Nofal A, Salah E. Acquired poikiloderma: proposed classification and diagnostic approach. *J Am Acad Dermatol.* settembre 2013;69(3):e129-140.

80. Jang MS, Kang DY, Park JB, Han SH, Lee KH, Kim JH, Ko JW, Suh KS. Clinicopathological Manifestations of Ichthyosiform Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol.* gennaio 2016;96(1):100–1.
81. Massone C, Kodama K, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients. *Am J Surg Pathol.* aprile 2005;29(4):550–60.
82. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* ottobre 2017;92(10):1085–102.
83. Ea O. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. *Dermatol Clin.* ottobre 2015;33(4):643–54.
84. Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, Carlotti A, Franck N, Dechelotte P, Souteyrand P, Courville P, Joly P, Delaunay M, Bagot M, Grange F, Fraitag S, Bosq J, Petrella T, Durlach A, De Mascarel A, Merlio JP, Wechsler J. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood.* 1 aprile 2000;95(7):2212–8.
85. Yumeen S, Girardi M. Insights Into the Molecular and Cellular Underpinnings of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Yale J Biol Med.* marzo 2020;93(1):111–21.
86. Schrader AMR, Jansen PM, Willemze R. TOX expression in cutaneous T-cell lymphomas: an adjunctive diagnostic marker that is not tumour specific and not restricted to the CD4(+) CD8(-) phenotype. *Br J Dermatol.* agosto 2016;175(2):382–6.
87. Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Feinmesser M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* agosto 2006;55(2):276–84.
88. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS, International Society for Cutaneous Lymphoma. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* dicembre 2005;53(6):1053–63.
89. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, Wood GS, Willemze R, Demierre MF, Pimpinelli N, Bernengo MG, Ortiz-Romero PL, Bagot M, Estrach T, Guitart J, Knobler R, Sanches JA, Iwatsuki K, Sugaya M, Dummer R, Pittelkow M, Hoppe R, Parker S, Geskin L, Pinter-Brown L, Girardi M, Burg G, Ranki A, Vermeer M, Horwitz S, Heald P, Rosen S, Cerroni L, Dreno B, Vonderheid EC, International Society for Cutaneous Lymphomas, United States Cutaneous Lymphoma Consortium, Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Clinical end points and response criteria

in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 giugno 2011;29(18):2598–607.

90. Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. settembre 2019;94(9):1027–41.
91. Scheffer E, Meijer CJ, Van Vloten WA. Dermatopathic lymphadenopathy and lymph node involvement in mycosis fungoides. *Cancer*. 1 gennaio 1980;45(1):137–48.
92. Sausville EA, Worsham GF, Matthews MJ, Makuch RW, Fischmann AB, Schechter GP, Gazdar AF, Bunn PA. Histologic assessment of lymph nodes in mycosis fungoides/Sézary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma): clinical correlations and prognostic import of a new classification system. *Hum Pathol*. novembre 1985;16(11):1098–109.
93. Clendenning WE, Rappaport HW. Report of the Committee on Pathology of Cutaneous T Cell Lymphomas. *Cancer Treat Rep*. aprile 1979;63(4):719–24.
94. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallae M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH. Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 novembre 2015;33(32):3766–73.
95. Kamijo H, Miyagaki T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Curr Treat Options Oncol*. 7 gennaio 2021;22(2):10.
96. Kaye FJ, Bunn PA, Steinberg SM, Stocker JL, Ihde DC, Fischmann AB, Glatstein EJ, Schechter GP, Phelps RM, Foss FM. A randomized trial comparing combination electron-beam radiation and chemotherapy with topical therapy in the initial treatment of mycosis fungoides. *N Engl J Med*. 28 dicembre 1989;321(26):1784–90.
97. Shipman AR, Scarisbrick J. New Treatment Options for Mycosis Fungoides. *Indian J Dermatol*. febbraio 2016;61(1):119.

98. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol.* febbraio 2014;70(2):223; 240–2.
99. Lindahl LM, Fenger-Grøn M, Iversen L. Secondary cancers, comorbidities and mortality associated with nitrogen mustard therapy in patients with mycosis fungoides: a 30-year population-based cohort study. *Br J Dermatol.* marzo 2014;170(3):699–704.
100. Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Gniadecki R, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. Minimizing adverse side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br J Dermatol.* agosto 2006;155(2):261–6.
101. Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC, Bexarotene Worldwide Study Group. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 maggio 2001;19(9):2456–71.
102. Duvic M, Martin AG, Kim Y, Olsen E, Wood GS, Crowley CA, Yocum RC, Worldwide Bexarotene Study Group. Phase 2 and 3 clinical trial of oral bexarotene (Targretin capsules) for the treatment of refractory or persistent early-stage cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* maggio 2001;137(5):581–93.
103. Gniadecki R, Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* settembre 2007;157(3):433–40.
104. Whittaker S, Ortiz P, Dummer R, Ranki A, Hasan B, Meulemans B, Gellrich S, Knobler R, Stadler R, Karrasch M. Efficacy and safety of bexarotene combined with psoralen-ultraviolet A (PUVA) compared with PUVA treatment alone in stage IB-IIA mycosis fungoides: final results from the EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force phase III randomized clinical trial (NCT00056056). *Br J Dermatol.* settembre 2012;167(3):678–87.
105. Funk A, Hensley F, Krempien R, Neuhof D, Van Kampen M, Treiber M, Roeder F, Timke C, Herfarth K, Helmbold P, Debus J, Bischof M. Palliative total skin electron beam therapy (TSEBT) for advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol EJD.* giugno 2008;18(3):308–12.
106. Huber MA, Kunzi-Rapp K, Staib G, Scharffetter-Kochanek K. Management of refractory early-stage cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) with a combination of oral bexarotene and psoralen plus ultraviolet bath therapy. *J Am Acad Dermatol.* marzo 2004;50(3):475–6.
107. Photiou L, van der Weyden C, McCormack C, Miles Prince H. Systemic Treatment Options for Advanced-Stage Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Curr Oncol Rep.* 23 marzo 2018;20(4):32.

108. Suchin KR, Cassin M, Gottlieb SL, Sood S, Cucchiara AJ, Vonderheid EC, Rook AH. Increased interleukin 5 production in eosinophilic Sézary syndrome: regulation by interferon alfa and interleukin 12. *J Am Acad Dermatol*. gennaio 2001;44(1):28–32.
109. J J Scarisbrick, P Taylor, U Holtick, Y Makar, K Douglas, G Berlin, E Juvonen, S Marshall. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *aprile 2008;158(4):659–78*.
110. Sanford KW, Anderson J, Roseff S, McPherson RA. Iron Deficiency Anemia in Patients Undergoing Extracorporeal Photopheresis for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Lab Med*. 1 gennaio 2019;50(1):29–33.
111. Quaglino P, Maule M, Prince HM, Porcu P, Horwitz S, Duvic M, Talpur R, Vermeer M, Bagot M, Guitart J, Papadavid E, Sanches JA, Hodak E, Sugaya M, Berti E, Ortiz-Romero P, Pimpinelli N, Servitje O, Pileri A, Zinzani PL, Estrach T, Knobler R, Stadler R, Fierro MT, Alberti Violetti S, Amitay-Laish I, Antoniou C, Astrua C, Chaganti S, Child F, Combalia A, Fabbro S, Fava P, Grandi V, Jonak C, Martinez-Escala E, Kheterpal M, Kim EJ, McCormack C, Miyagaki T, Miyashiro D, Morris S, Muniesa C, Nikolaou V, Ognibene G, Onida F, Osella-Abate S, Porkert S, Postigo-Llorente C, Ram-Wolff C, Ribero S, Rogers K, Sanlorenzo M, Stranzenbach R, Spaccarelli N, Stevens A, Zugna D, Rook AH, Geskin LJ, Willemze R, Whittaker S, Hoppe R, Scarisbrick J, Kim Y. Global patterns of care in advanced stage mycosis fungoides/Sézary syndrome: a multicenter retrospective follow-up study from the Cutaneous Lymphoma International Consortium. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 marzo 2019;30(3):494.
112. O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, Bartlett N, Popplewell L, Coiffier B, Lechowicz MJ, Savage KJ, Shustov AR, Gisselbrecht C, Jacobsen E, Zinzani PL, Furman R, Goy A, Haioun C, Crump M, Zain JM, Hsi E, Boyd A, Horwitz S. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 marzo 2011;29(9):1182–9.
113. Foss FM, Girardi M. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. aprile 2017;31(2):297–315.
114. Akpek G, Koh HK, Bogen S, O'Hara C, Foss FM. Chemotherapy with etoposide, vincristine, doxorubicin, bolus cyclophosphamide, and oral prednisone in patients with refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer*. 1 ottobre 1999;86(7):1368–76.
115. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Gniadecki R, Klemke CD, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Pimpinelli N, Quaglino P, Ranki A, Scarisbrick J, Stadler R, Väkevä L, Vermeer MH, Whittaker S, Willemze R, Knobler R. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome - Update 2017. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. maggio 2017;77:57–74.

116. Wu PA, Kim YH, Lavori PW, Hoppe RT, Stockerl-Goldstein KE. A meta-analysis of patients receiving allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplant in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. agosto 2009;15(8):982–90.
117. Hughes CFM, Khot A, McCormack C, Lade S, Westerman DA, Twigger R, Buelens O, Newland K, Tam C, Dickinson M, Ryan G, Ritchie D, Wood C, Prince HM. Lack of durable disease control with chemotherapy for mycosis fungoides and Sézary syndrome: a comparative study of systemic therapy. *Blood*. 1 gennaio 2015;125(1):71–81.
118. Smolowitz R, Hanley J, Richmond H. A three-year retrospective study of abdominal tumors in zebrafish maintained in an aquatic laboratory animal facility. *Biol Bull*. ottobre 2002;203(2):265–6.
119. Kent ML, Bishop-Stewart JK, Matthews JL, Spitsbergen JM. *Pseudocapillaria tomentosa*, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (*Danio rerio*) kept in research colonies. *Comp Med*. agosto 2002;52(4):354–8.
120. Matthews JL. Common diseases of laboratory zebrafish. *Methods Cell Biol*. 2004;77:617–43.
121. Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*. aprile 2002;1(3):229–31.
122. Stern HM, Murphey RD, Shepard JL, Amatruda JF, Straub CT, Pfaff KL, Weber G, Tallarico JA, King RW, Zon LI. Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish *bmyb* mutant. *Nat Chem Biol*. dicembre 2005;1(7):366–70.
123. Berghmans S, Jette C, Langenau D, Hsu K, Stewart R, Look T, Kanki JP. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *BioTechniques*. agosto 2005;39(2):227–37.
124. Goessling W, North TE, Zon LI. New waves of discovery: modeling cancer in zebrafish. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 giugno 2007;25(17):2473–9.
125. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 28 maggio 1981;291(5813):293–6.
126. Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*. aprile 1998;18(4):345–9.
127. Spitsbergen J. Imaging neoplasia in zebrafish. *Nat Methods*. luglio 2007;4(7):548–9.

128. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE, Zon LI. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*. 7 febbraio 2008;2(2):183–9.
129. Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 ottobre 2007;104(44):17406–11.
130. Stoletov K, Klemke R. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene*. 31 luglio 2008;27(33):4509–20.
131. Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*. novembre 2002;1(1 Pt 1):41–8.
132. Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther*. luglio 2007;82(1):70–80.
133. Booterabi F, Manouchehri H, Changizi R, Barker H, Palazzo E, Saltari A, Parikka M, Pincelli C, Aspatwar A. Zebrafish as a Model Organism for the Development of Drugs for Skin Cancer. *Int J Mol Sci*. 18 luglio 2017;18(7):E1550.
134. Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Camb Engl*. dicembre 1996;123:1–36.
135. D J Grunwald, G Streisinger. Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet Res*. aprile 1992;59(2):103–16.
136. Hason M, Bartůněk P. Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes*. 15 novembre 2019;10(11):E935.
137. Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol N Y N*. agosto 2006;8(4):329–45.
138. Hawkes JW. The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res*. 1974;149(2):147–58.
139. Chang WJ, Hwang PP. Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2011;93(3):205–14.
140. Mulero MC, Wang VYF, Huxford T, Ghosh G. Genome reading by the NF- $\kappa$ B transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 4 novembre 2019;47(19):9967–89.

141. C J Secombes, T Wang, S Bird. The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol.* dicembre 2011;35(12):1336–45.
142. Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis.* 2006;9(3):139–51.
143. Lisa M J Lee, Elisabeth A Seftor, Gregory Bonde, Robert A Cornell, Mary J C Hendrix. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn.* agosto 2005;233(4):1560–70.
144. Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Dev Camb Engl.* novembre 2003;130(21):5281–90.
145. Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, Nickoloff BJ, Topczewski J, Hendrix MJC. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med.* agosto 2006;12(8):925–32.
146. M S Okihiro, D E Hinton. Progression of hepatic neoplasia in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Carcinogenesis.* giugno 1999;20(6):933–40.
147. Beckwith LG, Moore JL, Tsao-Wu GS, Harshbarger JC, Cheng KC. Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* marzo 2000;80(3):379–85.
148. Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D, Hendricks JD, Bailey GS. Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. *Toxicol Pathol.* ottobre 2000;28(5):716–25.
149. Lam SH, Gong Z. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle Georget Tex.* marzo 2006;5(6):573–7.
150. Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CDM, Morris JP, Liu TX, Schulte-Merker S, Kanki JP, Plasterk R, Zon LI, Look AT. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 gennaio 2005;102(2):407–12.
151. Shepard JL, Amatruda JF, Stern HM, Subramanian A, Finkelstein D, Ziai J, Finley KR, Pfaff KL, Hersey C, Zhou Y, Barut B, Freedman M, Lee C, Spitsbergen J, Neuberg D, Weber G, Golub TR, Glickman JN, Kutok JL, Aster JC, Zon LI. A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 settembre 2005;102(37):13194–9.
152. Guor Mour Her, Chia-Chang Chiang, Wen-Ya Chen, Jen-Leih Wu. In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Lett.* marzo 2003;538(1–3):125–33.



153. Beis D, Stainier DYR. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* febbraio 2006;16(2):105–12.
154. Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP, Lin S, Prochownik E, Trede NS, Zon LI, Look AT. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science.* 7 febbraio 2003;299(5608):887–90.
155. Goessling W, North TE, Zon LI. Ultrasound biomicroscopy permits in vivo characterization of zebrafish liver tumors. *Nat Methods.* luglio 2007;4(7):551–3.
156. Lee LMJ, Seftor EA, Bonde G, Cornell RA, Hendrix MJC. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* agosto 2005;233(4):1560–70.
157. Feitsma H, Cuppen E. Zebrafish as a Cancer Model. *Mol Cancer Res.* 27 maggio 2008;6(5):685–94.
158. Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res.* 1 aprile 2007;67(7):2927–31.
159. Daroczi B, Kari G, McAleer MF, Wolf JC, Rodeck U, Dicker AP. In vivo radioprotection by the fullerene nanoparticle DF-1 as assessed in a zebrafish model. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 dicembre 2006;12(23):7086–91.
160. Lally BE, Geiger GA, Kridel S, Arcury-Quandt AE, Robbins ME, Kock ND, Wheeler K, Peddi P, Georgakilas A, Kao GD, Koumenis C. Identification and biological evaluation of a novel and potent small molecule radiation sensitizer via an unbiased screen of a chemical library. *Cancer Res.* 15 settembre 2007;67(18):8791–9.
161. My-La CD4+ 95051032 | Sigma-Aldrich [Internet]. Disponibile su: <http://www.sigmaaldrich.com/>
162. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509–44.
163. Bioz Ratings For Life-Science Research [Internet]. Disponibile su: [https://www.bioz.com/search/J\\_Genet\\_Syindr\\_Gene\\_Ther\\_2013\\_Apr\\_03\\_51ff](https://www.bioz.com/search/J_Genet_Syindr_Gene_Ther_2013_Apr_03_51ff)
164. Sernicola A, Russo I, Silic-Benussi M, Ciminale V, Alaibac M. Targeting the cutaneous lymphocyte antigen (CLA) in inflammatory and neoplastic skin conditions. *Expert Opin Biol Ther.* marzo 2020;20(3):275–82.
165. Hisataka Kobayashi, Peter L Choyke. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* agosto 2019;52(8):2332–9.



## RINGRAZIAMENTI

*Vorrei dedicare qualche riga a coloro che hanno contribuito al completamento del mio percorso di studi, della realizzazione della mia tesi di laurea e non solo.*

*Vorrei ringraziare innanzitutto i miei genitori e la mia famiglia, che mi hanno seguito e sostenuto, passo dopo passo con instancabile pazienza, in questo lungo ed insidioso percorso.*

*Un ringraziamento speciale agli “Illuminati e Brillanti”, che in questi ultimi anni hanno rappresentato per davvero la mia seconda famiglia e mi hanno permesso di terminare gli studi e di non impazzire nei momenti più difficili. Ma in realtà anche molto altro...*

*Un ringraziamento va senza ombra di dubbio anche al mio coinquilino Pezz, che mi ha accompagnato dall'inizio alla fine di questo percorso, sopportando con incessante pazienza tutti i miei difetti ma beneficiando, al contempo, dei miei numerosissimi pregi.*

*Per la stesura della tesi vorrei ringraziare con tutto il cuore Laurence e Pezz per la parte dell'abstract. Margherita e Lavinia, che hanno permesso alla parte introduttiva di godere di nuova forma e vigore. Un ringraziamento enorme va anche a mia madre che si è impegnata nella prima correzione di tutto l'elaborato e nella realizzazione dei grafici. Una menzione speciale anche per Gaia che ha giocato un ruolo fondamentale nell'interpretazione dei dati e a Sofia senza la quale sarei ancora impegnato a tradurre le didascalie. Per la parte statistica vorrei ringraziare per i preziosi consigli Paolo e la prof.ssa Frigo, mentre per la parte laboratoristica e di imaging non posso che essere grato per l'enorme lavoro a Natascia. Non posso non ringraziare Diletta, per esserci sempre stata e per aver reso molto più leggeri e divertenti i pomeriggi passati in clinica dermatologica.*

*Ultimo ma non per importanza una menzione speciale va anche a Jack che, tramite le sue conoscenze pregresse date dalla frequentazione del celebre Liceo Classico F.Capece, ha permesso la metamorfosi della mia tesi da baco in farfalla.*

*Infine, dedico questa tesi a me stesso, ai miei innumerevoli sacrifici e alla mia tenacia, che mi hanno permesso di arrivare fin qui.*

*Grazie a tutti, anche a coloro che non ho citato, senza di voi non ce l'avrei mai fatta!*